ARCHIVES ROUMAINES
DE PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE MICROBIOLOGIE

TOME V *N° 2* *JUIN 1932*

MÉMOIRES ORIGINAUX

COMPOSITION CHIMIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE DU LIQUIDE CAVITAIRE CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES

(Physiologie de la calcification)

par

M^lle^ Aristie DAMBOVICEANU

(Travail de l'Institut de Sérologie de Bucarest)

INTRODUCTION

La notion de l'immunité a dû se présenter à l'esprit humain aussitôt qu'est devenue évidente la possibilité pour certains organismes vivants de guérir spontanément et même de résister à telle ou telle maladie contagieuse.

Malgré son ancienneté, l'immunologie ne sort d'un certain état d'empirisme qu'à la suite des observations de Jenner et de leur application à la vaccination antivariolique; elle ne devient une science exacte qu'après les admirables découvertes de Pasteur sur l'atténuation des microbes pathogènes. Orientée au début vers

la pratique médicale, elle permet à la médecine de combattre avec éclat la maladie et la mort par l'emploi des sérums et des vaccins dans la prophylaxie des maladies contagieuses.

Mais lorsque l'on reconnaît l'importance de l'application des réactions d'immunité dans les phénomènes de biologie générale, ainsi que dans ceux de chimie biologique et colloïdale, l'intérêt suscité par cette science devient considérable.

Le nombre des travaux ayant pour but l'étude des principes fondamentaux d'immunologie augmente continuellement ; en mettant à contribution toutes les méthodes techniques dont disposent actuellement la chimie et la physico-chimie, les expérimentateurs ont pu faire des observations des plus intéressantes.

Il a été prouvé qu'il existait une immunité chez les invertébrés, qu'il existait même une immunité chez les végétaux. On a constaté en plus que la spécificité des réactions d'immunité était due à la présence dans la composition des antigènes de certains polysaccharides. Isolés et débarrassés par purifications successives de toutes traces de protéines, ces *hydrates de carbone* appelés « antigène résiduel », sont capables de précipiter *in vitro* les anticorps respectifs. Par contre, inoculés à des animaux, ils ne déterminent l'apparition d'anticorps que s'ils sont injectés en même temps qu'une protéine quelconque.

Malgré les progrès réalisés, la nature des anticorps, ainsi que le mécanisme de certaines réactions d'immunité, restent des problèmes que les expérimentateurs sont encore loin d'avoir résolus.

C'est que l'on avait affaire d'un côté à l'être vivant, et, de l'autre, à des mélanges de complexité désespérante tels que les bactéries ou le sérum sanguin.

Il est permis d'espérer qu'en essayant d'étudier les réactions des organismes vivants plus simples, comme les invertébrés ou les végétaux vis-à-vis d'antigènes dont la composition serait mieux connue (mélanges de polysaccharides et de protéines purifiés), on pourrait pénétrer un peu plus avant dans la connaissance des principes fondamentaux de l'immunologie.

Le professeur J. Cantacuzène est un de ceux qui ont le plus contribué à préciser la nature des phénomènes d'immunité chez les invertébrés.

Chargé par la Société de Biologie de faire, à l'occasion de la célébration du soixante-quinzième anniversaire, un rapport sur le problème de l'immunité chez les invertébrés, il le termine de la manière suivante :

« L'intérêt très grand que présente l'étude de l'immunité chez

les invertébrés, réside dans le fait que les actions d'anticorps semblent revêtir chez eux un caractère *plus imparfait et plus simple* que chez les mammifères, et aussi dans cette constatation qu'il règne, entre les différents groupes, une irrégularité et une inégalité, vraiment décevantes, dans la forme et l'intensité des réactions humorales vis-à-vis d'antigènes donnés.

« Il est permis d'espérer que l'analyse méthodique et minutieuse des conditions qui, chez ces espèces très voisines, accompagnent la présence ou l'absence (peut-être seulement apparente) des anticorps, contribuera puissamment à dégager l'essentiel des phénomènes d'immunité.

« *Mais, pour cela, il est indispensable de déterminer,* pour chaque cas particulier, *les constantes physico-chimiques normales du milieu intérieur* chez l'espèce étudiée. C'est ainsi qu'il y aurait le plus grand intérêt à pouvoir établir une corrélation entre la présence ou l'absence de certains constituants albuminoïdes du plasma, d'une part, et de l'autre, la présence ou l'absence de telle ou telle catégorie d'anticorps. Il y a là un travail préalable qui n'a été fait jusqu'ici que très imparfaitement et faute duquel l'effort expérimental risque de demeurer vain et stérile quant à la solution du problème que nous poursuivons. »

Nous avons cité ce passage *in extenso,* parce qu'il résume, mieux que nous n'aurions pu le faire, les motifs pour lesquels le professeur Cantacuzène nous a engagé à entreprendre l'étude chimique et physico-chimique du liquide cavitaire chez les invertébrés.

Quelques essais, ayant pour but de voir quelles étaient les réactions d'immunité chez les crustacés décapodes, avaient montré qu'on pouvait mettre en évidence, dans le sang des Maïas, une substance anti-complémentaire, de même que des agglutinines naturelles pour le bacille typhique et les globules rouges de mouton; à la suite de plusieurs injections immunisantes, le titre agglutinant du sang s'élevait nettement.

Le liquide cavitaire des crabes sacculinés contient des agglutinines et des précipitines pour une bouillie de sacculine externe traitée par l'alcool et reprise par une solution physiologique de Na Cl.

Le liquide cavitaire d'Eupagurus prideauxi possède un pouvoir neutralisant vis-à-vis du poison d'Adamsia.

Comme le sang des crustacés décapodes est généralement riche en substances protéiques; comme, malgré la découverte de l'antigène résiduel, le rôle des protéines reste incontestable dans les

phénomènes d'immunité ; et comme enfin une première série de recherches nous avait permis de constater une élévation du taux des protéines dans le liquide cavitaire des siponcles immunisés (5 à 9 centigrammes %, siponcles normaux; 30 à 70 centigrammes %, siponcles immunisés), nous nous sommes proposé d'étudier les modifications physico-chimiques imprimées au liquide cavitaire des crustacés décapodes par certains états pathologiques et à la suite de plusieurs injections immunisantes.

Pour entreprendre cette étude, il était absolument indispensable d'établir quelle était la composition du liquide cavitaire des animaux à l'état normal et de voir ensuite si elle pouvait être influencée par des états physiologiques aussi importants que la mue.

C'est l'Astacus fluviatilis qui nous a permis en premier lieu de faire les observations les plus complètes, grâce à la facilité de nous le procurer pendant tous les mois de l'année et de le garder assez longtemps en captivité au laboratoire. A la station biologique de Roscoff, nous avons eu l'occasion de compléter ces observations par l'étude d'autres espèces de crustacés sur le liquide cavitaire desquels nous avons déterminé quelques constantes et surtout le contenu en substances protéiques (Maïa squinado, Cancer pagurus, Palinurus vulgaris, Homarus vulgaris, Eupagurus prideauxi et Carcinus mænas).

Le professeur Cantacuzène est non seulement l'inspirateur de ce travail, mais au cours de nos recherches, il nous a constamment aidé par le grand intérêt qu'il porte toujours aux travaux faits sous sa direction, ainsi que par des conseils et des suggestions qui nous permettaient souvent de réaliser nos meilleures expériences. Nous le prions d'accepter, en même temps que nos remerciements reconnaissants, l'expression de notre dévouement, ainsi que de la plus profonde affection.

Qu'il nous soit permis d'adresser à M. Perez, le directeur de la station biologique de Roscoff, nos remerciements pour son aimable accueil. C'est grâce à sa bienveillance que nous avons eu la possibilité de faire, d'année en année, nos recherches dans de meilleures conditions techniques.

Au moment de grouper et d'exposer les résultats de nos recherches, nous nous rendons parfaitement compte des problèmes qui se posent encore, ainsi que des objections que l'on pourrait faire à certaines de nos expériences.

Pourtant, au point de vue qui nous intéressait spécialement, nous croyons avoir pu établir avec certitude qu'il est impossible

d'entreprendre une étude des modifications de la composition du liquide cavitaire chez l'Astacus, à la suite de l'immunisation, sans tenir compte de l'état physiologique de l'animal au moment de l'expérience.

La mue *provoque chez l'Astacus et probablement chez tous les crustacés des changements profonds dans le métabolisme des différentes substances qui composent le liquide intérieur.* Des essais d'immunisation faits à cette époque (fin avril-fin septembre) pourraient conduire à des interprétations des plus erronées.

L'étude des conditions physiques et physico-chimiques qui favorisent la consolidation de la nouvelle carapace, nous a permis, de plus, de constater que, pendant les 48-60 heures qui suivent la chute de la carapace, le sang acquiert *périodiquement* la propriété de précipiter le calcium *in vitro*. Le plasma des mammifères (chiens, lapins) en train de consolider une fracture osseuse quelconque, présente un phénomène analogue, bien que beaucoup moins évident. L'effet thérapeutique du sérum des convalescents (de fractures osseuses) dans le traitement des consolidations retardées, serait-il dû à l'apparition de ce pouvoir précipitant ? S'agit-il d'un ferment ? Quelques expériences préalables semblent confirmer cette hypothèse. Nous nous proposons d'essayer de résoudre ce problème par des recherches ultérieures et d'étudier en même temps la nature du précipité de calcium obtenu *in vitro*.

Ce mémoire sera composé de la manière suivante :

Première partie. — La coagulation chez les crustacés décapodes.

Deuxième partie. — Composition physico-chimique du liquide cavitaire normal chez les crustacés décapodes en dehors de la mue.

Troisième partie. — Variations provoquées par la mue.

Quatrième partie. — Contribution à l'étude du phénomène de la calcification. Essais d'interprétation du mécanisme de la calcification.

Note additionnelle. — Modification du liquide cavitaire chez l'Astacus après une saignée ou une inoculation avec un antigène quelconque, ainsi que chez les crabes parasités par la sacculine.

Conclusions.

Bibliographie.

PREMIÈRE PARTIE

LA COAGULATION CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES

La coagulation du sang chez les crustacés décapodes a attiré l'attention de nombreux expérimentateurs, parce que les animaux de ce groupe sont les premiers parmi les organismes vivants inférieurs qui présentent une prise en masse de leur liquide cavitaire parfaitement analogue à la coagulation du sang chez les mammifères. Cette question possède une riche bibliographie; nous ne mentionnerons que les travaux de Fredericq, Heim, Halliburton, Nolf, et dernièrement ceux de Loeb et de Tait qui, par leurs précieuses observations, ont réussi à établir les faits suivants :

Il existe, chez les crustacés décapodes, deux phases nettement distinctes dans le phénomène de la coagulation.

Première phase : prise en masse des éléments figurés du liquide intérieur. Cette agglutination est due à une substance (fibrine cellulaire) qui résulte de la destruction des cellules. Elle a pour résultat la mise en liberté d'un ferment qui, en agissant sur le fibrinogène soluble dans le plasma, provoque la *deuxième phase* de la coagulation, c'est-à-dire la gélification de toute la masse liquide.

Nous exposerons assez brièvement nos propres observations en n'insistant que sur les faits qui seront susceptibles de compléter les connaissances sur la coagulation du sang chez les crustacés décapodes.

Nos recherches ont toujours été faites sur le liquide provenant de la cavité générale. Pour l'obtenir, on ponctionnait, dans la majorité des cas, la base d'une des pattes de l'animal à l'aide d'une pipette Pasteur légèrement coudée. On pouvait recueillir de la sorte, suivant la taille de l'animal, de 2 à 3 centimètres cubes (Astacus) jusqu'à 100 à 150 cc. (Homard ou Langouste).

Pour saigner à blanc les animaux de petite taille, nous avons observé qu'il était préférable de ponctionner la membrane qui séparait la partie dorsale du thorax de la partie abdominale. Le liquide montait rapidement dans la pipette et permettait d'extraire en une seule fois la presque totalité du contenu de la cavité générale.

Astacus (fluviatilis).

En ponctionnant la membrane articulaire de la patte d'un Astacus de taille moyenne, on obtient environ 3 à 4 centimètres cubes d'un liquide opalescent, incolore ou à peine rosé. Il bleuit au contact de l'air et se trouble au bout de quelques secondes, en formant un voile qui se contracte peu à peu et prend l'aspect d'une masse spongieuse surnageant un liquide parfaitement limpide et légèrement bleuâtre. Le liquide séparé par centrifugation et décantation forme, suivant les cas, au bout de cinq à vingt minutes, un gel très peu rétractile qui laisse difficilement diffuser le sérum. L'Astacus présente donc les deux phases de la coagulation décrites par Loeb :

a) Altération et agglutination consécutive des éléments figurés;

b) Coagulation proprement dite, c'est-à-dire gélification et transsudation du sérum.

L'oxalate de potassium à 3/1000, le citrate de sodium à 3/1000, ainsi que le fluorure de sodium à 2/1000, empêchent la gélification du plasma, mais ne manifestent pas la moindre influence sur l'agglutination des éléments figurés.

Il n'en est pas de même lorsque l'on emploie le chloroforme ou le chlorhydrate de cocaïne. Le liquide intérieur des écrevisses, mélangé en parties égales avec une solution à 1 % de chlorhydrate de cocaïne, ne se trouble plus; les éléments figurés gardent leurs caractères morphologiques; ils restent arrondis, intacts, non agglutinés, en suspension dans le plasma ; au bout de quelque temps, ils se déposent au fond du vase. Le plasma légèrement opalescent, obtenu après décantation, reste *indéfiniment incoagulable*.

Si on lave le culot cellulaire avec une solution de Na Cl (0,75 %) qui contient 0,5 % de cocaïne, jusqu'à l'élimination des albumines du plasma, et si on le réémulsionne dans une solution physiologique pure, on constate que la suspension se trouble au bout de quelques secondes; les cellules, après avoir repris leur mobilité, émettent de nombreux pseudopodes asciculaires et

forment bientôt un amas spongieux pareil en tout à celui qui apparaît spontanément dans le liquide intérieur de l'Astacus après la saignée.

Cette expérience prouve que l'agglutination des éléments figurés est due à une substance que les cellules elles-mêmes mettent en liberté. D'ailleurs, elle a été décrite chez la majorité des invertébrés, et nous-même avons observé et décrit un phénomène parfaitement analogue chez l'Anodonta cyanœa, dont le liquide cavitaire est presque complètement dépourvu de substances protéiques.

Si on maintient un Astacus pendant trente minutes dans une atmosphère chargée de *vapeurs chloroformiques*, on observe après la saignée que le sang est devenu incoagulable, les éléments figurés se déposent sur le fond du vase. Le plasma séparé rapidement par centrifugation reste incoagulable.

L'héparine agit comme les anticoagulants salins, elle empêche la gélification du plasma sans influencer aucunement l'agglutination des éléments figurés.

Il ressort de ces recherches que le liquide intérieur de l'Astacus subit, après la sortie du corps : *une première modification* qui a pour résultat l'agglutination des éléments figurés en une petite masse spongieuse surnageant un liquide limpide coloré en bleu, phénomène presqu'immédiatement consécutif à la saignée, et une *deuxième modification* se produisant beaucoup plus tard, le plus souvent au bout de dix à vingt minutes, parfois même douze à vingt-quatre heures après la saignée. Elle a pour résultat visible la formation d'un gel très peu rétractile.

La coagulation de toute la masse sanguine ne peut avoir lieu si, par des anesthésiques comme la cocaïne ou le chloroforme, on empêche les éléments figurés d'éclater et de mettre en liberté une substance capable de précipiter le fibrinogène soluble dans le plasma. Comme chez les mammifères, l'immobilisation *des ions calcium*, par l'oxalate de potassium, empêche le fibrinogène d'être précipité de sa solution par le fibrine-ferment.

Le phénomène de la coagulation sanguine chez les crustacés décapodes supérieurs est donc parfaitement analogue à celui décrit chez les mammifères; pourtant, le fibrine-ferment sécrété par les cellules de l'Astacus est tout aussi inactif sur le plasma héparinisé de cheval que le fibrine-ferment du sérum de cheval sur le plasma héparinisé d'écrevisse.

Cette affirmation nous a été fournie par l'expérience suivante :

1° Plasma d'écrevisse héparinisé + extrait de broyage de muscle d'écrevisse = coagulation au bout de cinq minutes.

2° Plasma d'écrevisse héparinisé + extrait de broyage de muscle d'écrevisse chauffé à 100° (10 minutes) = pas de coagulation.

3° Plasma d'écrevisse héparinisé + sérum frais de cheval = absence de coagulation.

4° Plasma de cheval héparinisé + broyage de muscle d'écrevisse = absence de coagulation.

5° Plasma de cheval héparinisé + sérum frais de cheval = coagulation.

PALINURUS VULGARIS (Langouste).

Un animal de 1 1/2 à 2 kilos peut fournir, en une seule saignée, 120 à 150 centimètres cubes de liquide intérieur. Nettement coloré en rose orangé et trouble à la sortie du corps, il prend vite une teinte bleu violacé s'il est agité au contact de l'air. Deux à trois minutes après la saignée, on voit apparaître de gros flocons qui forment bientôt une masse compacte surnageant un liquide parfaitement limpide et coloré en bleu violacé. C'est la première phase de la coagulation semblable en tout à celle que nous avons décrite chez l'écrevisse. Quinze à vingt minutes plus tard, toute la masse sanguine forme un bloc gélifié très compact, sans la moindre trace de rétractilité. Pour obtenir du sérum, il faut broyer le caillot et le laisser s'égoutter sur un entonnoir. Le meilleur moyen d'obtenir du sérum est de défibriner le sang avec des perles de verre, immédiatement après la saignée, tout comme pour celui des mammifères.

HOMARUS VULGARIS (Homard), EUPAGURUS PRIDEAUXI (Eupagure).

Le sang du homard, de même que celui de l'Eupagure, se comporte comme celui de la langouste. Ils présentent les deux phases de la coagulation du sang des crustacés, c'est-à-dire :

1° Altération et agglutination des éléments figurés;

2° Prise en masse consécutive du plasma et formation d'un gel très peu rétractile.

MAÏA SQUINADO.

Le liquide cavitaire est souvent incolore, parfois légèrement coloré en rose ou rose orangé, quelquefois opalescent, d'autres

fois trouble à la sortie du corps de l'animal. Comme le sang de l'Astacus, il présente la première phase de la coagulation, c'est-à-dire altération et agglutination des éléments figurés. Par contre, le liquide limpide, que surnage le caillot spongieux, ne présente pas de gélification en masse. Il nous est arrivé d'examiner parfois du sang de Maïa qui formait un gel presque fluide qu'il suffisait d'agiter pour en séparer le sérum.

Portunus depurator (Crabe nageur).

Le sang des crabes nageurs est incolore chez les uns, coloré en jaune orangé chez les autres, parfois opalescent, d'autres fois trouble à la sortie du corps. Il bleuit s'il est agité en présence de l'air. Il présente la première phase de la coagulation du sang des crustacés décapodes; quant à la deuxième, elle est extrêmement réduite; on ne voit apparaître que de petites masses gélifiées qui adhèrent à la paroi du vase; au bout de vingt-quatre heures, on constate que tout le liquide forme une gelée demi-fluide qui laisse diffuser le sérum après une simple agitation et centrifugation.

Cancer pagurus (Tourteau).

Le liquide cavitaire est en général incolore ou légèrement coloré en rose, parfois opalescent, d'autres fois un peu trouble à la sortie du corps. Il ne présente que la première phase de la coagulation des crustacés décapodes.

Carcinus maenas (Crabe).

Liquide cavitaire incolore ou rose, légèrement opalescent à la sortie du corps; il bleuit faiblement au contact de l'air. Il présente, comme chez tous les invertébrés, la première phase de la coagulation; quant à la deuxième, elle est réduite à une gélification partielle qui, parfois, se traduit par la formation de petits îlots gélifiés adhérant aux parois de verre.

En résumé, chez les *Décapodes Macroures* (Ecrevisse, Homard, Langouste, Eupagure), on distingue deux phases dans la coagulation du sang :

Première phase : destruction et agglutination des éléments figurés avec mise en liberté d'un fibrine-ferment.

Deuxième phase : gélification de toute la masse sanguine à la suite de la précipitation du fibrinogène dissous dans le plasma sous l'action du fibrine-ferment, en présence des sels de calcium.

Au moment de la mue, dans les heures qui précèdent et qui suivent immédiatement la chute de la carapace, on observe, à part les nombreuses modifications de la composition du liquide intérieur que nous décrirons dans un chapitre spécial, une augmentation considérable du pouvoir coagulant du sang. Pour pouvoir saigner un animal à ce moment, il faut aspirer son sang directement avec une pipette chargée d'un anticoagulant quelconque, sans cela il risque de boucher la pipette en coagulant presqu'instantanément sur les parois du verre.

A la même époque, le sang se colore fortement en rose orangé. Cette coloration semble être due à la mobilisation d'une partie du lipochrome de la vieille carapace qui est transporté par le liquide intérieur vers la nouvelle carapace.

Chez les *Crustacés Brachyoures* (Maïa, Crabe, Crabe nageur), c'est surtout *la première phase* de la coagulation *qui est évidente*; la *deuxième, extrêmement réduite,* ne se manifeste que par la formation d'îlots gélifiés adhérents aux parois du vase.

Pourtant, au moment de la mue, toute la masse sanguine forme une espèce de gelée demi-fluide qu'il suffit d'agiter pour en libérer le sérum. Il y a donc, chez eux aussi, une augmentation du pouvoir coagulant du liquide intérieur au moment de la mue. On observe en même temps une coloration intense en rose due, comme chez les Macroures, à la mobilisation du lipochrome accumulé dans l'ancienne carapace.

DEUXIÈME PARTIE

COMPOSITION DU LIQUIDE INTÉRIEUR CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES EN DEHORS DE LA MUE

Chapitre Premier

CARACTÈRES PHYSICO-CHIMIQUES

Les caractères physico-chimiques du liquide cavitaire chez les crustacés décapodes sont relativement peu connus. Bottazzi et Fredericq donnent, pour le delta du sang de quelques crustacés décapodes, les valeurs suivantes :

Carcinus Mænas	2,17
Maïa	2,13
Maïa Roscoff	2,07
Homard	2,29
Astacus	0,80

Ils constatent en plus que le résidu minéral du sang des animaux marins varie avec la composition saline du milieu ambiant. Fredericq a réussi à faire baisser le delta du sang de Maïa de 2,90 à 1,40, en baissant celui du milieu ambiant de 2,95 à 1,25. Ces modifications ne s'observent pas chez l'Astacus même s'il séjourne dans une eau très pauvre en sels (0,02 à 0,03). Bottazzi étudie la viscosité du liquide cavitaire de différents crustacés sans trouver des différences appréciables entre eux. Quant à la réaction du milieu, Heim dit avoir constaté que le sang des crustacés rougissait légèrement la phénolphtaléine. Bottazzi, par contre, affirme qu'il s'agissait d'une réaction alcaline au tournesol et acide à la phénolphtaléine.

Nos recherches, plus complètes pour l'Astacus, portent sur les constantes suivantes : *indice réfractométrique*, *p*H (méthode

colorimétrique et électrométrique), *delta cryoscopique, conductibilité électrique, viscosité et densité.*

Nous ne donnerons, pour les crustacés décapodes marins, que les constantes dont la détermination pouvait être réalisée avec les moyens techniques plus réduits dont nous disposions à la station biologique de Roscoff.

Les résultats de nos recherches, sur la composition physico-chimique du liquide intérieur chez les crustacés décapodes, sont résumés dans le tableau suivant :

	Indice réfracto-métrique		*p*H	Delta	Conductibilité électrique K. 18	Viscosité Hess
Astacus	(1,34199-1,34612)		7,77-7,83	-0,60	0,016003	1,2-1,45
Maïa	—	—	7,8 -7,9	-2,025	—	1,2-1,3
Carcinus Mænas.	—	—	7,6 -7,7	-2,08-2,10	—	1,35
Palinurus vulgar.	—	—	7,4	-2,29	—	1,5
Homarus	—	—	7,6 -7,7	-2,25	—	1,4
Eupag. prideauxi.	—	—	7,45	—	—	1,6
Portunus depur..	—	—	7,6 -7,7	-2,10	—	1,3
Cancer pagurus..	—	—	7,6 -7,7	-2,09	—	1,4

*p*H, eau de mer Roscoff..... 8,0-8-1
Delta, eau de mer Roscoff..... 2,01

Chapitre II

LA COMPOSITION CHIMIQUE DU LIQUIDE CAVITAIRE CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES

a) Substances minérales :

Halliburton, Dohrn, Witting, Griesbach, Griffits, Heim, Gautrelet, ainsi que de nombreux auteurs, ont étudié les cendres du sang chez les crustacés décapodes. Comme les résultats que l'on trouve dans cette riche bibliographie sont parfois contradictoires, nous avons préféré reprendre l'étude du résidu minéral du liquide cavitaire chez l'écrevisse. Il était surtout intéressant de voir si, au moment de la mue, pendant la calcification de la nouvelle carapace et même pendant la formation des réserves calcaires, il ne se produisait pas un déséquilibre dans le métabolisme des différents ions du liquide intérieur.

Nous exposerons, dans un des chapitres suivants, quels sont ceux, parmi les constituants des cendres, qui semblent être le plus influencés par la mue; pour le moment, nous donnerons dans le tableau suivant les chiffres entre lesquels varie le taux

des différents éléments qui composent les cendres du sang de l'Astacus fluviatilis à l'état normal.

	Gr. % de sang défibriné
Eau	95,30 - 94,80
Cendres	1,5 - 1,6
Chlore	0,6 - 0,7
Soufre	0,020 - 0,021
Phosphore	0,015 - 0,017
Sodium	0,160 - 0,170
Potassium	0,002 - 0,003
Calcium	0,036 - 0,043
Magnésium	0,014 - 0,017
Fer	Traces - 0,001
Cuivre	0,020 - 0,028

Pour le dosage des cendres, ainsi que des différents éléments, nous nous sommes servi des techniques classiques suivantes que nous nous contenterons de résumer rapidement :

Cendres (G. Bertrand, P. Thomas). — Incinération du sang défibriné dans une capsule de platine, au four électrique, à une température ne dépassant pas le rouge sombre jusqu'à disparition complète des substances organiques.

Pour le dosage des différents éléments, nous avons toujours employé la méthode de minéralisation liquide préconisée par Grabar-Blanchetière, dont le principe est le suivant : 1 à 5 centimètres cubes de plasma additionnés d'acide azotique concentré sont chauffés, pendant deux à trois heures, au bain-marie à 100°. Lorsque le volume du liquide est relativement réduit, on continue le chauffage sur un bain d'huile de vaseline à 180°, jusqu'à décoloration complète. Après évaporation, le résidu minéral, repris par l'eau distillée ou par une solution étendue d'acide azotique (selon les nécessités des dosages à faire ultérieurement), servait à la détermination quantitative de l'élément qui nous intéressait.

Dosage du phosphore (Javillier et D. Djelatides). — Principe : précipitation du phosphore comme phospho-molybdate d'ammonium; transformation du molybdène contenu dans le complexe en suboxyde de molybdène; oxydation de ce dernier par le permanganate de K.

Dosage du chlore (Laudat). — Principe : destruction organique, en présence d'un excès de nitrate d'argent, par un mélange de permanganate et d'acide azotique. Titration de l'excès de nitrate d'argent par le sulfocyanure de potassium.

Dosage du soufre (Browinsky). — Principe : précipitation du soufre à l'état de baryum pesé.

Dosage du sodium (technique de Blanchetière, modifiée par Grabar). — Principe : précipitation du sodium sous la forme d'un complexe lourd et insoluble, — sel de Streng, — acétate triple d'uranium, de magnésium et de sodium. Le poids du précipité, divisé par 60,43, donne la quantité de sodium contenue dans l'échantillon analysé.

Dosage du potassium (Kramer-Tisdall). — Principe : précipitation du K comme cobalto-nitrite insoluble, — permanganimétrie.

Dosage du calcium (technique de J. de Ward). — Principe : précipitation du calcium à l'état d'oxalate de calcium, — permanganimétrie.

Dosage du magnésium (technique de Canals). — Principe : précipitation du Mg comme phosphate ammoniaco-magnésien (PO_4 Mg NH_4). Dissolution du précipité dans l'acide chlorhydrique, titration de l'anhydre phosphorique formé par l'azotate d'urane.

Dosage du fer (technique de Maquenne). — Principe : formation du bleu de Prusse, comparaison de la couleur obtenue à une gamme préparée préalablement à l'aide d'une solution étalon d'alun de fer ammoniacal (0,43 gr. dissous dans 100 centimètres cubes d'acide sulfurique à 2 %).

Dosage du cuivre (Schoenheimer et Oshima). — Principe : minéralisation liquide du sérum, précipitation du cuivre à l'état de sulfure de cuivre. Détermination colorimétrique comme combinaison complexe de cuivre-pyridine-rhodan, colorée en vert.

b) Substances organiques.

La richesse du liquide intérieur des crustacés décapodes en subtances azotées a attiré l'attention de nombreux expérimentateurs. Delaunay, Bottazzi, Baglioni, Loeb, Krukenberg. Halliburton, Heim, donnent des chiffres extrêmement différents pour le contenu en protéines coagulables par la chaleur du liquide cavitaire chez les crustacés décapodes.

Des essais de séparation de ces mêmes protéines arrivent aussi le plus souvent à des résultats contradictoires. Ainsi, Halliburton est d'avis qu'après la coagulation spontanée du fibrinogène, il ne restait plus en solution que de l'hémocyanine ; Heim, par contre, dit avoir pu identifier une albumine vraie dans le sang des crustacés décapodes, après l'élimination des globulines par saturation avec du sulfate de magnésie.

Le liquide intérieur de tous les crustacés étudiés par lui (Maïa, Carcinus mænas, Cancer pagurus), est riche en albumines vraies, tandis qu'après la première phase de la coagulation du sang, les globulines semblent faire complètement défaut.

La présence de l'hémocyanine dans le sang de l'Astacus est constatée par Heim; Krukenberg soutient le contraire, tout en reconnaissant que le liquide intérieur est le plus souvent incolore chez l'Astacus. La bibliographie offre des contradictions analogues quant à la présence de l'hémocyanine dans le sang de Palinurus vulgaris, Carcinus mænas, Maïa squinado, etc.

La présence ou l'absence de l'urée, de l'acide urique, sont de même fortement discutées par Rabuteau, Rapillon, Halliburton, Heim, Dohrn et Witting, qui ont cherché à les mettre en évidence dans le liquide intérieur de différents crustacés décapodes.

Le rôle incontestable que les substances protéiques jouent dans les phénomènes d'immunité nous a poussé à accorder un intérêt spécial à leur détermination chez les crustacés décapodes.

Techniques employées. — *Protéines coagulables par la chaleur.* — Addition de chlorure de sodium (lorsque la solution était pauvre en électrolytes), acidification par l'acide acétique pour réaliser un *p*H compris entre 4,7 et 5. Chauffage au bain-marie à 100° pendant une heure. Le précipité, recueilli sur un filtre taré, est lavé à l'eau bidistillée bouillante jusqu'à élimination complète des sels, puis à l'alcool et à l'éther et enfin séché à 105° jusqu'à poids constant.

Pour le dosage des différentes fractions de substances protéiques, nous nous sommes servi comparativement de 4 méthodes :

1° Hofmeister (saturation par le *sulfate d'ammonium* : saturation à 33 %, précipitation des euglobulines; saturation à 50 %, précipitation des pseudo-globulines, et saturation à 100 %, précipitation des albumines vraies).

2° Hammarsten (saturation par le Na Cl à 100 %, précipitation du fibrinogène ; saturation à 100 % par le sulfate de magnésium, précipitation des globulines, et enfin saturation à 100 % par le sulfate d'ammonium, précipitation des albumines vraies).

3° Technique de Piettre et Villa (précipitation à froid des substances protéiques totales par l'acétone anhydre; extraction des albumines vraies par l'eau bidistillée). Cette technique a présenté, dans notre cas, l'avantage de nous permettre d isoler

l'hémocyanine qui passe en solution dans l'eau distillée en la colorant fortement en bleu. De la sorte, nous avons pu constater qu'elle se trouvait dans le liquide intérieur de tous les crustacés décapodes étudiés, même chez la Maïa qui, il est vrai, ne contient parfois de l'hémocyanine qu'à l'état de traces.

4° Enfin la méthode *réfractométrique de Reiss* (Abderhalden : *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*). Moins exacte que les méthodes gravimétriques, elle présente l'avantage de permettre d'effectuer des dosages sur de très petites quantités de liquide cavitaire.

Pour déterminer les points isoélectriques des protéines isolées par l'une ou l'autre des méthodes précédemment décrites, nous nous sommes servi comparativement de la méthode de la cataphorèse (appareil en U de Michaelis ou appareil de Todd. Pour les détails, voir bibliographie).

Les autres substances organiques du liquide intérieur, chez les crustacés décapodes, ont été déterminées d'après les procédés classiques suivants :

Urée : technique de Fosse (précipitation spécifique de l'urée à l'état de dixanthylurée).

Acide urique : méthode de Bénédict (défécation par l'acide wolframique, le filtrat mis en présence de l'acide arséno-phosphowolframique et du cyanure de sodium donne, en présence de l'acide urique, une coloration bleue que l'on compare à celle obtenue avec une solution étalon).

Azote non protéique : Micro-Kjeldahl (distillation de l'ammoniac obtenu après destruction organique, dans l'appareil de Parnas-Wagner).

Lipides : Laudat (extraction alcoolique à froid et à chaud de la totalité des lipides. Dosage de la cholestérine libre comme complexe digitonine-cholestérine. Après hydrolyse par la potasse alcoolique et acidification, extraction de la cholestérine libérée, ainsi que des acides gras avec de l'éther. Dosage dans l'extrait éthéré de la cholestérine. Dosage dans la solution aqueuse du phosphore libéré à la suite de l'hydrolyse).

Glucose : Hagedorn-Jensen et Fontes-Thivolle.

RÉSULTATS DE NOS RECHERCHES

ASTACUS FLUVIATILIS.

a) Protides : protéines coagulables par la chaleur. — Le liquide intérieur de l'Astacus est relativemnt riche en *protéines coagulables par la chaleur.* Leur taux varie généralement entre 3 gr. 84 et 4 gr. 78 pour 100 centimètres cubes de sang ; il diminue pendant la période d'hibernation (janvier-février) en s'abaissant à 3,20-3,32 gr. %. Au même moment, l'indice réfractométrique a une valeur minime 1,34197 (38 divisions de l'échelle réfractométrique), et la viscosité qui semble être fortement influencée par le taux des substances protéiques, baisse à 1,20-1,3.

En soumettant du plasma oxalaté à l'action de différents *p*H (mélanges tampons de Clark et Lubs réalisant des valeurs de *p*H allant de 3 à 9,2), nous avons constaté l'apparition de 3 zones de précipitation maxima : une première, la plus marquée, aux environs de *p*H 3,6; une deuxième, un peu moins prononcée, à un *p*H égal à 6,92; et enfin une troisième, la moins nette, située entre ces deux extrêmes, à *p*H 4,30.

Voici un tableau résumant ces résultats :

*p*H.....	3,10	3,49	3,62	4,10	4,28	4,60	4,83	5,10	5,35	6,92
Précipité.....	—	+—	+++	+	++	—	+	—	—	+++

Du plasma oxalaté soumis à la cataphorèse (appareil en U de Michaelis, 100 volts) pendant deux heures, à un *p*H égal à celui du liquide dans l'organisme (*p*H, 7,8), montre un déplacement manifeste, nettement contrôlable macroscopiquement, des protéines vers l'anode. Mais, si on recueille le liquide des deux pôles, on constate les réactions suivantes :

Anode : liquide trouble qui s'éclaircit peu à peu s'il est laissé au repos. On obtient un sédiment formé presque exclusivement de fins cristaux d'oxalate de calcium, le liquide surnageant est opalescent; acidifié et chauffé à 100°, ce même liquide donne un abondant coagulum.

Cathode : liquide parfaitement limpide ; acidifié et chauffé à 100°, il devient opalescent et bientôt l'on voit apparaître des traces à peine perceptibles d'albumine coagulée.

Il résulte de ces essais que la majorité des protéines contenues dans le plasma de l'Astacus possèdent une charge négative à *p*H 7,8. Pourtant, les traces d'albumine qu'on trouve à la cathode, ainsi que l'apparition d'une zone de précipitation aux environs

de la neutralité, permettent de faire la supposition qu'une des protéines du liquide intérieur de l'Astacus a son point isoélectrique assez rapproché de *p*H 7.

Du plasma oxalaté soumis à l'action précipitante des différents sels neutres nous a donné les résultats suivants :

Saturation à 50 % par l'acétate de potassium : apparition, au bout de quelques heures, d'un fin précipité.

Saturation à 50 % par le chlorure de sodium : pas de précipité.

Saturation à 100 % par le chlorure de sodium : précipité légèrement rosé.

Saturation à 28 % par le sulfate d'ammonium : pas de précipité.

Saturation à 33 % par le sulfate d'ammonium : précipité légèrement rosé.

Saturation à 100 % par le sulfate d'ammonium : précipité abondant rose bleuâtre.

Saturation à 50 % par le sulfate d'ammonium : précipité abondant rose bleuâtre.

En séparant par filtration les précipités obtenus, soit par saturation à 100 % par le sulfate de Mg, soit par saturation à 50 % par le sulfate d'ammonium, on obtient un filtrat nettement coloré en bleu qui coagule par chauffage à 100° et qui, saturé à 75° par le sulfate d'ammonium, donne un précipité bleu. Après élimination de ce dernier par filtration, le liquide incolore qu'on obtient ne coagule plus par chauffage à 100 %, de même qu'il ne précipite plus, par saturation à 100 %, avec le sulfate d'ammonium.

Si du plasma oxalaté est soumis à la dialyse pendant quarante-huit heures (vingt-quatre heures eau courante, vingt-quatre heures eau bidistillée), on obtient un précipité incolore de substances protéiques relativement dénaturées (car elles ne se redissolvent qu'incomplètement dans une solution isotonique de chlorure de sodium) et un liquide légèrement bleuâtre.

Enfin, si on ajoute à un volume de sérum ou de plasma oxalaté deux volumes et demi d'acétone, on obtient un abondant précipité coloré en bleu. Après filtration rapide à la trompe, le gâteau de protéines, lavé à l'acétone et à l'éther et remis en suspension dans l'eau distillée, se dissout partiellement. On obtient une solution fortement colorée en bleu et un précipité qui, bien que les opérations aient été faites à froid, reste partiellement insoluble dans la solution isotonique de chlorure de sodium.

Il ressort de la série d'expériences que nous venons de citer

que les substances protéiques coagulables par la chaleur du liquide intérieur de l'Astacus peuvent être séparées en deux ou même trois fractions :

1° Une première fraction, qui précipite à 50 % de saturation par l'acétate de potassium, à 100 % de saturation par le chlorure de sodium, ou à 33 % de saturation par le sulfate d'ammonium. Une dialyse de quarante-huit heures la précipite également en lui faisant perdre en partie sa solubilité dans le sérum physiologique neutre.

Cette fraction, purifiée par plusieurs précipitations, dialysée et finalement soumise à la calcination, donne des cendres qui ne manifestent pas la réaction du cuivre.

Si on précipite cette même fraction par les sels neutres, on entraîne en même temps le lipochrome, de sorte que le précipité obtenu est nettement coloré en rose orangé. Il devient rapidement incolore si on le lave avec de l'alcool ou de l'acétone qui entraînent le lipochrome.

2° Une deuxième fraction qui ne précipite totalement de sa solution qu'à 75 % de saturation par le sulfate d'ammonium (1 volume de plasma plus 3 volumes de solution saturée de sulfate d'ammonium).

Agitée en présence de l'air, sa solution, d'incolore devient nettement bleue.

En présence de grandes quantités d'électrolytes, de même qu'une précipitation par l'acétone, la coloration bleue reste stable. *Elle donne la réaction du biuret sans addition préalable de cuivre.*

Purifiée par plusieurs précipitations, dialysée et ensuite calcinée, elle donne *des cendres riches en cuivre*. Bien que relativement hydrophyle après une dialyse prolongée (8 à 10 jours), elle est presque complètement précipitée de sa solution aqueuse.

Ces caractères sont bien ceux du pigment respiratoire, décrit chez les crustacés décapodes, « *l'Hémocyanine* ».

Le pigment du sang d'Helix pomatia, que nous avions étudié antérieurement, comparable en tout à l'hémocyanine des crustacés décapodes, diffère par le fait qu'il est totalement précipité de sa solution à 50 % de saturation par le sulfate d'ammonium.

3° Le plasma de l'Astacus contient enfin des traces d'une troisième fraction qui s'apparente aux pseudo-globulines par le fait qu'elle reste en solution à 33 % de saturation par le sulfate d'ammonium, et qu'elle n'est précipitée de ses solutions qu'à 50 % de saturation par le sulfate d'ammonium.

Cette substance n'existe qu'à l'état de traces dans le plasma. Par contre, elle représente la majeure partie des globulines contenues dans le sérum. Nous l'appellerons dans ce mémoire fibrine-globuline.

Afin de caractériser ces fractions d'albumines par leurs points isoélectriques, nous avons utilisé la méthode suivante : le plasma héparinisé de six Astacus mâles et femelles, est reçu directement dans une solution saturée de sulfate d'ammonium, la saturation finale étant de 50 %. Il se forme immédiatement un abondant précipité jaunâtre qui est séparé par centrifugation de la solution bleue dans laquelle il restait en suspension. Cette portion liquide est saturée à 100 % par le sulfate d'ammonium; on obtient un précipité bleu qui est redissous dans l'eau distillée, reprécipité et enfin redissous et soumis à une dialyse de quarante-huit heures. Débarrassé de la sorte de l'excès d'électrolytes, il représente *la solution d'Hémocyanine (sol. A)*.

Le précipité jaunâtre est lavé à plusieurs reprises avec une solution saturée à 50 % par le sulfate d'ammonium, et finalement repris par de l'eau distillée. On obtient une solution légèrement jaunâtre qui, soumise à une dialyse de quarante-huit heures, se sépare en deux portions : un précipité incolore partiellement rendu insoluble qu'on reprend par la solution isotonique de Na Cl, il représente la *solution B* de nos expériences (fibrinogène ?), et enfin la fraction restée en solution après quarante-huit heures de dialyse, que nous avons appelée sol. C (solution de pseudo-globulines ?)

En soumettant ces trois solutions à l'action des ions H (mélanges tampons *p*H allant de 2,7 à 8,10), ou à un courant électrique dans le tube de cataphorèse en U de Michaelis, voici les observations que nous avons faites :

1° La fraction *A* (Hémocyanine) a une zone isoélectrique allant de *p*H 2,78 à 4,38, avec un optimum de précipitation à *p*H *3,58*.

2° La fraction *B* a une zone isoélectrique très large qui va de *p*H 3,84 à *p*H 7,10, avec un optimum de précipitation à *p*H *5,71*.

3° La fraction *C* (pseudo-globuline ?) a une zone isoélectrique restreinte comprise entre *p*H 3,22 et 4,88, avec un maximum de précipitation à *p*H *4,38*.

Les expériences de cataphorèse nous ont donné des résultats analogues, bien qu'un peu différents; hémocyanine, zone isoélectrique *p*H 3,4-4,6; pseudo-globuline, zone iso-électrique *p*H 4,6-

5,8. La cataphorèse ne nous a pas permis de caractériser le fibrinogène, à cause de l'instabilité de sa solution.

Voici un tableau résumant ces recherches :

				A			C				B			
*p*H	2,78	3,06	3,22	3,58	3,84	4,10	4,38	4,68	4,98	5,31	5,48	5,71	5,98	6,11	7,10
A..	+−	+−	++	(+++)	+−	+−	+−	−	−	−	−	−	−	−	−
B..	−	−	−	−	+−	+−	+−	+−	+−	+	+	(++)	+−	+−	+−
C..	−	−	+−	+−	+	+	(++)	+−	+−	−	−	−	−	−	−

La richesse du liquide intérieur de l'Astacus en protéines coagulables par la chaleur, ainsi que le taux des différentes fractions précédemment décrites, sont exposés dans le tableau qui suit. Ces chiffres résument les résultats de nombreux dosages faits comparativement sur le plasma citraté, ainsi que sur le sérum (liquide qui s'échappe du caillot lorsque la coagulation n'a pas été empêchée).

	Grammes pour 100 cc.			
	de plasma héparinisé		de sérum	
Albumines totales	4,31		4,36	
Hémocyanine	2,86		3,07	
Pseudoglobuline	0,39	1,45	0,92	1,28
Fibrinogène	1,062		0,36	
Viscosité	1,7		1,45	
Indice réfractométrique...	1,34392 (43,1 divisions) de l'échelle réfractométrique.		1,343394 (43,2 divisions)	

Il semble d'après l'examen de ce tableau que lorsque l'on supprime la prise en masse du liquide intérieur de l'Astacus par un anticoagulant, le taux des protéines totales coagulables par la chaleur reste sensiblement le même, bien qu'un peu plus élevé dans le sérum (4,31 gr. % plasma; 4,36 gr. % sérum), mais les rapports entre les différentes fractions varient notablement. La fraction précipitant à 33 % de saturation par le sulfate d'ammonium est trois fois plus abondante dans le plasma (1,062 gr. % de plasma et 0,36 gr. % de sérum); par contre, les fractions précipitant à 50 et 75 % de saturation pour le sulfate d'ammonium se trouvent en quantités plus grandes dans le sérum (0,39 gr. % et 2,86 gr. % de plasma; 0,92 gr. % et 3,07 gr. % de sérum). La viscosité, égale à 1,7 dans le plasma, baisse à 1,45 dans le sérum.

Palinurus vulgaris (Langouste).

Le liquide intérieur de la langouste était, au moment où nous

l'avons examiné (juillet-août), extrêmement riche en substances protéiques coagulables par la chaleur.

En le soumettant comparativement à l'action des sels neutres, du plasma citraté et du sérum, on observe à :

		Plasma citraté	Sérum
28 °/₀ de saturation	par le sulfate d'ammonium	pas de précipitation,	pas de précipitation.
50 —	— l'acétate de potassium.	flocons jaunâtres,	pas de précipitation.
33 —	— le sulfate d'ammonium	précipité jaune rosâtre,	pas de précipitation.
50 —	— — —	précipité jaune rosé,	précipité jaune rose.
100 —	— le sulfate de magnésium	précipité abondant,	précipité abondant.
75 —	— — d'ammonium	précipité abondant bleu,	précipité abondant bleu.

1° Il existe donc, dans le plasma citraté de la langouste, une substance de nature protéique qui est précipitée de sa solution *à 50 % de saturation par l'acétate de K*, ou à *33 % de saturation par le sulfate d'ammonium*. Cette substance est de même précipitée à 100 % de saturation par le Na Cl et par une dialyse de quarante-huit heures; *elle n'existe pas dans le sérum*, C'est le fibrinogène.

Si on sépare, par filtration, le précipité obtenu en saturant le plasma de langouste à 33 % par le sulfate d'ammonium, et si l'on ajoute au filtrat limpide du sulfate d'ammonium jusqu'à saturation à 50 %, le liquide devient légèrement opalescent, *mais il n'y a pas de précipitation*. Par contre, si le sérum est saturé à 33 % par le sulfate d'ammonium, il devient à peine opalescent; il faut pousser la saturation à 50 % pour observer l'apparition d'un précipité.

2° Il semble donc exister dans le plasma de langouste une deuxième fraction protéique qui présente les caractères des pseudo-globulines; on ne la trouve qu'à l'état de traces dans le plasma, tandis qu'elle est nettement dosable dans le sérum. Nous l'appellerons fibrino-globuline.

3° Le plasma, ainsi que le sérum, contiennent chez la langouste, aussi bien que chez l'Astacus, une troisième fraction qui précipite seulement à 75 % de saturation par le sulfate d'ammonium. La solution bleuit au contact de l'air, ses cendres sont riches en cuivre, c'est le pigment respiratoire ou l'hémocyanine.

Le plasma citraté de langouste soumis à l'action de ions H, de

même qu'à la cataphorèse, nous a permis d'identifier les trois fractions par leurs points isoélectriques.

Fibrinogène : zone isoélectrique *p*H 5-*p*H 7, minimum de charge aux environs de *p*H 6 (1).

Pseudoglobuline (fibrine-globuline) : zone isoélectrique *p*H 3,8-*p*H 5,2, minimum de charge *p*H 4,5.

Hémocyanine : zone isoélectrique *p*H 3,4-*p*H 4,2, minimum de charge *p*H *3,9*.

Voici les chiffres entre lesquels varie, chez la langouste, le taux de la totalité des substances protéiques, ainsi que celui de leurs différentes fractions :

	Plasma citraté gr. % cc.	Sérum gr. % cc. de liquide
Substances protéiques totales ...	6,68 - 8,70	5,93 8,165
Hémocyanine	5,55 - 7,89	5,55 7,045
Fibrinogène	0,72 - 0,78	absent
Pseudo-globuline (fibrine-globuline) indosable	0,34	0,38 1,12

L'hémocyanine représente la majeure partie des substances protéiques du plasma et du sérum de langouste; rapportées à 100, elles se comportent de la manière suivante :

	Plasma	Sérum
Hémocyanine	84 - 90 %	92 - 86 %
Fibrinogène	16 - 9	absent
Pseudoglobuline (fibrine-globuline)	0 - 1	8 - 14

En dosant comparativement l'hémocyanine dans du sérum privé des globulines, soit par 100 % de saturation au sulfate de magnésium, soit par 50 % de saturation au sulfate d'ammonium, nous avons trouvé pour elle des valeurs très voisines. Dans le premier cas, 5 gr. 885; dans le deuxième, 5 gr. 900 pour 100 centimètres cubes de sérum. Par la technique de Piettre et Villa, le même échantillon de sérum ne nous a donné que 5 gr. 40 d'hémocyanine pour 100 centimètres cubes.

(1) Le point isoélectrique du fibrinogène est plus difficile à déterminer, à cause de la vitesse avec laquelle cette substance est rendue insoluble par la dialyse ou par les solvants des lipoïdes. Il nous est même arrivé de constater, en saignant une langouste mourante, que de son plasma fluoré précipitait spontanément, au bout de douze heures, une substance protéique qui ne pouvait plus être mise en solution qu'en présence d'un excès d'acide ou de base.

HOMARUS VULGARIS.

Le taux des protéines coagulables par la chaleur contenues dans 100 centimètres cubes de liquide intérieur chez le homard, variait à la même époque entre 3 gr. 4 et 5 gr. 86.

EUPAGURUS PRIDEAUXI.

Le liquide intérieur de l'eupagure est très riche en substances protéiques coagulables par la chaleur; leur taux variait, en juillet-août, entre 6 et 8 grammes pour 100 centimètres cubes de liquide.

Nous avons pu caractériser chez lui, comme chez la langouste, 3 fractions protéiques qui diffèrent entre elles, sauf les caractères déjà cités, par les températures de coagulation.

Fibrinogène	56°
Fibrine-globuline	75° - 69°
Hémocyanine	64° - 65°

BRACHYOURES.

Le liquide intérieur des brachyoures est en général beaucoup plus pauvre en protéines coagulables par la chaleur que celui des macroures. Le fibrinogène *n'existe qu'à l'état de traces* chez les animaux en dehors de la mue. Son taux augmente avant la chute de la carapace. C'est au même moment que l'on observe, après l'agglutination des éléments figurés, une sorte de gélification du plasma (gel presque fluide), gélification qui, en général, n'existe pas en dehors de la mue.

MAÏA SQUINADO.

Le sang de Maïa est relativement pauvre en substances protéiques; il contient très peu d'hémocyanine, parfois même rien que des traces.

	Gr. % cc.
Substances protéiques totales	1,52
Globulines	1,18
Pseudoglobulines	1,16
Fibrinogène	0,02
Hémocyanine	0,10

PORTUNUS DEPURATOR.

Le dosage de la totalité des substances protéiques coagulables par la chaleur, ainsi que des différentes fractions contenues dans le liquide intérieur du crabe nageur, nous a donné les résultats suivants :

Albumines totales	3,64 - 4	gr. % cc.	de sang
Hémocyanine	0,96 - 1	—	—
Globulines	2,68 - 2,98	—	—

Cancer pagurus.

Le taux des protéines coagulables par la chaleur contenues dans le liquide intérieur du tourteau varie entre 3 et 4 grammes %. Elles peuvent être fractionnées, comme chez le Maïa, en trois fragments présentant les mêmes caractères physico-chimiques et chimiques que ceux isolés du sang de Maïa.

Carcinus mænas.

Le liquide intérieur des crabes, en dehors de la mue, contient environ 2,10 à 2,20 gr. de protéines coagulables par la chaleur pour 100 centimètres cubes. Ces protéines peuvent être fractionnées en trois portions :

	Gr. % cc.
Albumines totales coagulables à 100° ..	2,20
Hémocyanine	1,19
Globulines	0,81
Pseudoglobulines	0,31
Fibrinogène	0,50

Albumoses, Peptones.

Chez tous les crustacés décapodes que nous avons étudiés, le liquide intérieur ne contenait *ni albumoses, ni peptones.* Après élimination des protéines coagulables par la chaleur, la réaction du biuret, ainsi que toutes les autres réactions des substances protéiques, ont constamment été négatives.

Azote non protéique. Acides aminés. Ammoniac. Urée, acide urique.

Après élimination des protéines coagulables par la chaleur, le liquide intérieur de l'Astacus contenait, en général, 0,006 à 0,008 gr. d'azote non protéique %. Les réactions des *acides aminés,* ainsi que celles de l'ammoniac, ont toujours été négatives.

Le dosage de l'urée par la méthode de Fosse nous a permis de mettre en évidence des quantités allant de 0,0068 à 0,0070 gr. pour 100 centimètres cubes de liquide intérieur.

On trouve aussi de *l'acide urique,* son taux variant entre 0,002 et 0,0024 gr. %.

Lipides.

La présence ou l'absence des lipides chez les crustacés décapodes n'a pas fait l'objet d'une étude spéciale de la part des

différents expérimentateurs. La totalité des lipides contenus dans le liquide intérieur de l'Astacus varie, en général, entre 0,50 et 0,59 gr. pour 100 centimètres cubes.

Les différentes fractions déterminées par la méthode de Laudat se trouvent dans les proportions suivantes :

	Gr. pour 100 cc. de liquide intérieur.				
	Totalité des lipides	Cholest. libre	Lipoïdes phosphorés	Cholest. éthérifiée	Lipochrome
Astacus	0,50 - 0,59	0,049	traces	0,03 gr. %	0,42
Eupagurus prideauxi...	0,52	0,0182	0,0543	0,0037	0,440
Maïa squinado.....	0,11	0,0121	0,0350	—	0,060 gr.

Glucides.

Le liquide intérieur d'Astacus contient *0,16 à 0,20* gr. de sucre réducteur exprimé en glucose pour 1000 centimètres cubes, si le dosage est effectué immédiatement après la saignée de l'animal. Quelques heures plus tard, il semble complètement dépourvu de sucres réducteurs. Cette constatation nous permet de conclure à la présence d'un ferment glycolytique dans le liquide intérieur de l'Astacus.

Ferments.

Heim dit avoir mis en évidence un ferment amylolytique, ainsi qu'un ferment protéolytique dans le sang du crabe, des Homards et des Maïas. Fleig, Abelous et Portier trouvent des oxydases dans le sang des crustacés.

Nos recherches nous ont montré que le liquide intérieur de l'Astacus, bien *débarrassé par centrifugation de ses éléments figurés,* ne contient ni *oxydase,* ni *peroxydase,* ni *catalase.* De même, il ne contient pas de *ferments protéolytiques* (pepsine, trypsine).

Par contre, nous avons pu mettre en évidence un ferment amylotique. Au bout de quarante-huit heures, 5 % de la quantité d'amidon ajoutée à sa solution était transformée en glucose. (Technique : 25 centimètres cubes de solution d'amidon à 0,5 % + 5 centimètres cubes de mélange de phosphates m/3 (*p*H 6,8) + 1 centimètre cube *de plasma*; séjour de quarante-huit heures à 37°. Dosage du glucose par la méthode de Bertrand. Témoin, 25 centimètres cubes sol. d'amidon + 5 centimètres cubes mélange tampon *p*H 6,8 + 1 centimètre cube de salive).

TROISIÈME PARTIE

MODIFICATION DE LA COMPOSITION DU LIQUIDE INTÉRIEUR CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES, EN TRAIN DE MUER

La mue est une des particularités des crustacés décapodes qui rend l'étude de leur liquide intérieur extrêmement intéressante.

La bibliographie n'offre pourtant que de rares données, un travail d'ensemble sur les modifications de la composition chimique et physico-chimique du liquide intérieur des crustacés au moment de la mue faisant presque complètement défaut.

Nos recherches ont porté surtout sur l'Astacus. Grâce à la facilité de nous le procurer et de le garder pendant de longs mois en captivité au laboratoire, il nous a permis de l'étudier plusieurs années de suite et de faire de nombreuses observations que nous exposons dans ce chapitre spécial, afin de mieux attirer l'attention sur elles.

La mue correspond chez les crustacés à un accroissement de la taille des animaux. Elle a lieu surtout en été, se répétant chez les tout jeunes 6 à 7 fois à partir de fin avril jusqu'à mi-octobre.

Dans la deuxième année de leur vie, les Astacus muent 3 à 4 fois et, enfin, une écrevisse de grande taille mue en général deux fois.

La première mue commence fin avril et finit fin juillet. La deuxième mue commence en septembre pour finir mi-octobre. Une des premières modifications qui a attiré notre attention chez les animaux approchant de la mue était la coloration de leur liquide intérieur. Celui-ci d'incolore devenait nettement rose ou rose orangé. De plus, immédiatement avant et *surtout après* la chute de la carapace, le sang de l'Astacus coagule si vite qu'il bouche la pipette et rend la saignée des animaux extrêmement difficile.

L'indice réfractométrique qui, chez une écrevisse normale, varie entre 34 et 47 divisions de l'échelle réfractométrique (1,34199-1,34575), monte chez l'écrevisse qui approche de la mue, allant parfois jusqu'à 68 divisions de l'échelle réfractométrique (1,35316). Cette modification de l'indice réfractométrique est si constante qu'elle nous permettait, à la fin, d'isoler avec certitude les Astacus devant muer quelques heures après nos déterminations.

Ainsi, parmi 50 Astacus qu'on nous avait procurés le 29 mai 1928, nous avons eu la surprise de constater qu'il n'y avait que cinq mâles, le reste étant des femelles.

En examinant l'indice réfractométrique du sang des 5 mâles et des 12 femelles, nous avons trouvé les valeurs suivantes :

Mâles :

Indice	1,3 5031	1,3 5013	1,3 5260	1,3 5316	1,3 5163
Div. réfract...	60,2	59,8	66,5	68	64

Femelles :

Indice	1,3 4426	4639	4654	4361	4440	5307	4772	4954	4575	4336	4623	4500
Div. réfract...	44	49,7	50,1	42,3	57,8	67,8	53,3	58,2	48	41,6	49,3	46

Toutes les femelles étaient porteuses d'œufs; une seule qui s'en était débarrassée, avait un plasma dont l'indice était égal à 1,35307 (67,8 div. réfract.).

Les cinq mâles, ainsi que la femelle, furent isolés du reste des écrevisses et tenus en observation. Tous ont perdu leur carapace dans les vingt-quatre heures suivantes. Cette observation explique pourquoi, sur les 50 Astacus procurés à la fin de mai, 45 étaient des femelles. Les mâles en train de muer restaient probablement cachés dans les retraites, afin que, pendant la calcification de leur nouvelle carapace, ils soient à l'abri de la voracité de leurs congénères.

En saignant les animaux qui avaient mué au bout de sept jours, lorsque la nouvelle carapace semblait complètement calcifiée, nous avons constaté que le liquide intérieur était redevenu incolore et à peine opalescent à la sortie du corps. La coagulabilité était redevenue normale et l'indice réfractométrique avait des valeurs comprises entre 38 et 50 divisions de l'échelle réfractométrique (38, 42, 43,3, 44, 40,5).

Un mois après ces premières déterminations, la majorité des femelles avaient perdu leurs œufs. En examinant le liquide intérieur de 10 d'entre elles, nous avons constaté qu'il commençait à se colorer et que l'indice avait atteint les valeurs suivantes :

	(1)	*	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Indice.....	1,3	*5106	4780	4768	4984	5106	4873	4746	4910	5143	5021
Div. réfrac.		*62,3*	53,5	53,2	59	*62,3*	56	52,6	57	*63,3*	*60*

Les animaux 9 et 10 faisaient partie du lot dont le liquide intérieur avait eu, un mois à l'avance, un indice compris entre 40 et 50 divisions du réfractomètre.

Les Astacus 1, 5, 9 et 10 ont été séparés et tenus en observation; l'un d'eux ayant perdu sa carapace au bout de vingt-quatre heures, les trois autres ont été saignés et leur sang rendu incoagulable par le citrate de soude; l'analyse nous a montré que la composition du plasma citraté était la suivante :

Eau	92,8 gr. pour 100 cc.
Résidu sec	7,28 — —
Résidu volatil	6,18 — —
Cendres	1,02
Subst. prot. totales.....	6,505
Fibrinogène (Euglobulines)...	4,15 gr. pour 100 cc.
Pseudoglobulines	0,570
Hémocyanine	1,76
Calcium	55,8 mgr. pour 1000 cc.
*p*H	8

En déterminant l'indice réfractométrique qui se traduit, suivant cette première expérience, par une augmentation considérable du taux des protéines coagulables par la chaleur, de même qu'en notant l'apparition et la disparition des gastrolithes (réserves calcaires connues populairement sous le nom d'yeux d'écrevisse), nous avons groupé dans les recherches ultérieures les animaux plus ou moins éloignés de la mue d'après le schéma suivant :

1° *Astacus normal.* — Astacus éloigné de la mue qui n'a pas encore de réserve calcaire et dont le liquide intérieur est incolore. Indice égal à 1,34392 (38-43 div. de l'échelle réfractométrique).

2° *Astacus se préparant pour la mue.* — Liquide intérieur coloré en rose. Indice au-dessus de 1,34654 (50 divisions de l'échelle réfractométrique), début de formation calcaire.

3° *Astacus au voisinage immédiat de la mue.* — Liquide intérieur fortement coloré en rose. Indice réfracto-

* A cause de l'espace restreint, nous n'avons pas pu mettre en face de chaque numéro, le *1,3*.

métrique au-dessus de 1,35021 (60 divisions de l'échelle réfractométrique), formations calcaires de grande taille.

4° *Astacus immédiatement après la chute de la carapace* (carapace molle). — Formation calcaire intacte, sang extrêmement coagulable. Indice variant selon les conditions plus ou moins favorables dans lesquelles s'est fait la chute de la carapace entre 50 et 40 divisions de l'échelle réfractométrique.

5° *Astacus partiellement consolidé* (carapace légèrement calcifiée). — Réserve calcaire réduite à moitié.

6° *Astacus complètement consolidé* (carapace nettement calcifiée bien que très fragile). — Réserve calcaire complètement disparue.

Nous avons pu de la sorte suivre les variations des différentes substances dissoutes dans le plasma, et voir lesquelles parmi elles semblaient jouer un rôle plus important dans le phénomène de la mue.

Voici les résultats de nos recherches :

I. Variations des constantes physico-chimiques.

Parmi les caractères physico-chimiques du liquide intérieur chez l'Astacus, c'est surtout *l'indice réfractométrique* qui présente les variations les plus importantes. Le *p*H, sensiblement constant dans le reste du temps, augmente pendant la calcification de la nouvelle carapace, atteignant parfois des valeurs allant jusqu'à 8,3. La viscosité semble être influencée par la coagulabilité du sang; nous avons trouvé les plus grandes valeurs immédiatement après la chute de la carapace, lorsque le sang coagulait presqu'instantanément. Le delta augmente légèrement dans la période qui précède immédiatement la chute de la carapace.

Voici un tableau résumant ces variations :

	Division de l'échelle réfracto-métrique	Indice réfractométrique	*p*H	Δ	Viscosité (Hess)
Astacus avant la chute de la carapace :					
1. Sans réserves calcaires	42	1,34360	7,77 - 7,83	0,59	1,35
2. Début de formations calcaires	50	1,34654	—	—	—

3. Formations calcaires de grande taille.	68	1,35021	7,77 - 7,83	0,70	1,45
Astacus après la chute de la carapace :					
4. Carapace molle (réserve calcaire intacte)	48	1,34575	8,2 - 8,3	—	1,70
5. Carapace mi-consolidée (réserve calcaire à moitié disparue)	43	1,34392	—	—	—
6. Carapace consolidée (réserve calcaire disparue)	38	1,34199	7,8 - 7,9	0,60	1,25

II. Variations des substances minérales.

	Grammes pour 100 cc. de plasma						
	Cendres	Calcium	Magnésium	Sod.	Potas.	Chlore	Phosph.
Astacus normal ..	1,5 -1,6	0,036-0,043	0,0150	0,17	0,003	0,5-0,6	0,017
Astacus avant la mue.....	0.97-1,48	0,052-0,060	0,0128	0.14	0,00213	0,6	0,010-0,021
Carapace molle...	0,60-0,97	0,047-0,050	0,015-0,018	0,13	traces	0,4-0,5	0,010-0,015
Carapace consolidée.....	0,79-1,07	0 036-0,042	0,014-0,017	0,17	0,003	0,6-0,7	0,011-0,012

Le fer existe à l'état de traces; nous n'avons pas pu mettre en évidence le manganèse.

Les chiffres réunis dans ce tableau nous montrent que, *sauf le calcium,* le taux des cendres, ainsi que celui des autres éléments anorganiques, ne varie pas, ou fait assez surprenant, baisse légèrement dans le plasma de l'Astacus pendant toute la période de la mue.

Le calcium augmente aussi bien pendant la formation des gastrolithes que pendant la calcification de la nouvelle carapace. Pourtant, cette augmentation reste beaucoup au-dessous de celle signalée par certains auteurs chez les Maïas, en train de muer.

On ne peut expliquer cette différence que par le fait que les Maïas ne fabriquent pas de réserves calcaires. Elles prennent les sels de chaux nécessaires à la consolidation dans le milieu ambiant, le sang étant de la sorte le réservoir naturel des sels de calcium.

Il serait intéressant de voir si ces différences se maintiennent pour tout le groupe des Macroures vis-à-vis du groupe des Brachyoures.

III. Variations des substances organiques.

Le taux des substances organiques chez l'écrevisse, *au voisinage de la mue, atteint des valeurs qui sont 2 à 3 fois plus grandes* que chez l'écrevisse normale. Cette élévation s'observe en même temps que le début de la formation des réserves calcaires. Elle atteint un maximum dans les dernières heures qui précèdent la chute de la vieille carapace. De nombreuses analyses nous ont permis de voir que, parmi les substances organiques, ce sont surtout *les protéines coagulables par la chaleur* qui, par l'augmentation considérable de leur taux, déterminent et l'élévation de l'indice réfractométrique signalée dans le chapitre précédent et l'élévation du poids des substances organiques.

L'augmentation du taux des protéines revient presque exclusivement à la fraction qui précipite à 33 % de saturation par le sulfate d'ammonium *(fibrinogène)*, lorsqu'il s'agit du plasma, et à celle qui précipite à 50 % de saturation par le sulfate d'ammonium, lorsqu'il s'agit du sérum.

L'azote non protéique est légèrement augmenté immédiatement avant la chute de la carapace : 0,016 gr. %, au lieu de 0,012 gr. %, comme chez l'écrevisse en dehors de la mue.

Nous avons trouvé, pour le taux de l'urée et de l'acide urique, des chiffres légèrement au-dessus des valeurs normales.

Variations des substances azotées chez l'Astacus en train de muer :

	Valeurs moyennes exprimées en grammes pour 100 centimètres cubes de plasma						
Avant la mue :	Protéine tot. coag. à 100°	Fibrinogène 33 % sat. par le sulfate d'ammonium	Pseudoglobulines 50 % sat. par le $SO_4(NH_4)_2$	Hémocyanine	N. non protéique	Urée	Acide urique
Astacus normal..	4,52	1,34	0,28	2,90	0,102	0,068	0,022
Début de réserve calcaire	6,50	4,157	0,57	1,76	—	—	—
Immédiatement av. la chute de la carapace.....	8,40	5,34	0,56	2,50	0,16	0,079	0,031
Après la mue :							
Carapace molle. Réserve calcaire intacte	6,05	4,29	0,50	1,26	—	—	—
Carapace mi-consolidée. Réserve calcaire réduite.	4,088	2,71	0,55	0,82	—	—	—
Carapace consolidée et pas de réserve calcaire...	4,24	1,34	0,62	2,28	0,12	0,870	0,023

IV. Variations des lipides.

Le liquide intérieur de l'Astacus en dehors de la mue contient environ 0,50 gr. % de lipides. Aux approches de la mue, le taux des lipides augmente en devenant deux fois plus grand (1,002 %).

Des essais de dosages comparatifs, faits par la méthode de Laudat, nous ont permis de fractionner l'extrait alcoolique comme l'indique le tableau suivant :

Variations des lipides dans le liquide de l'Astacus en train de muer :

	Extrait éthéré total	Cholest. libre, gr. pour 100 cc.	Lécithides	Cholest. éthérifiée	Acides gras	Non déterminé, lipochrome?
Astacus normal.	0,53	0,049	absentes	0,0032	0,023	0,465
Astacus avant la mue (petite réserve calcaire).	0,486	0,110	absentes	0,0026	0.0346	0,372
Astacus avant la mue (grande réserve calcaire).	0,984	0,16	absentes	0,0240	0,090	0,71
Astacus après la mue (carapace molle)	0,285	0,104	absentes	0,0170	0,043	0,121
Astacus mi-consolidé	0,264	0,120	absentes	0,006	0,056	0,082
Astacus consolidé	0,50	0,048	absentes	0,003	0,022	0,427

Il y a donc, chez l'Astacus, dans la période qui précède la chute de la carapace, une augmentation assez importante du taux des lipides dissous dans le liquide intérieur. Cette augmentation semble assez également répartie entre les différentes fractions qui composent l'extrait éthéré. Il est intéressant à noter que le liquide intérieur de l'Astacus ne contient pas de lipoïdes phosphorés.

La majeure partie des substances solubles dans les solvants des lipoïdes est représentée chez l'Astacus par le lipochrome, dont le taux s'élève immédiatement avant la chute de la carapace en devenant deux fois plus grand que chez l'Astacus en dehors de la mue.

Contrairement aux affirmations de Vitzou, nous n'avons pas pu déceler de *glycogène* dans le sang des écrevisses, il n'existe pas plus en temps normal qu'au moment de la mue.

Quant au *glucose,* son taux baisse légèrement aux approches de la mue (*0,16* % écrevisse normale, *0,019* écrevisse immédiatement avant la mue).

V. Variations des ferments.

Après l'élimination des éléments figurés, le plasma de l'Astacus en train de muer semble être dépourvu aussi bien des ferments protéolytiques que de catalase et de peroxydase.

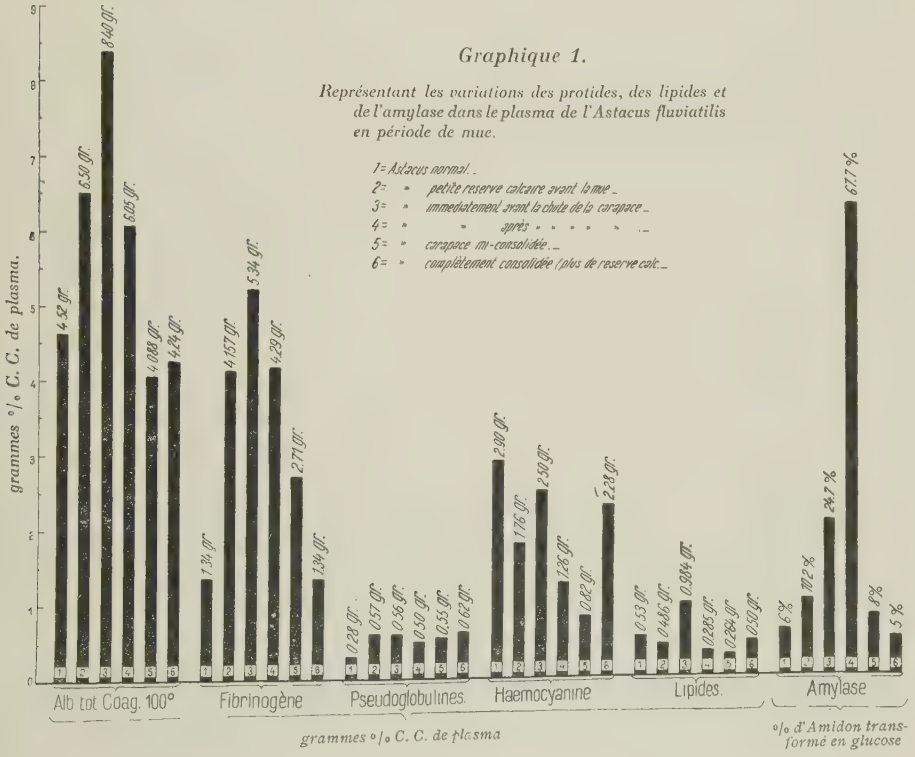
Par contre, le pouvoir amylolytique que nous avions déjà signalé chez l'écrevisse, en dehors de la mue, augmente chez l'Astacus qui vient de perdre sa carapace pour atteindre des valeurs 13 à 14 fois plus grandes que les normales.

Pouvoir amylolytique exprimé en % d'amidon transformé en glucose, au bout de 48 heures, par 1 centimètre cube de plasma citraté :

1. Astacus normal	6 %
2. Astacus avant la mue (petite réserve calcaire)	10,2
3. Astacus avant la mue (grande réserve calcaire)	24,7
4. Astacus après la mue (carapace molle)	67,7
5. Astacus mi-consolidé	8
6. Astacus consolidé	5

Graphique 1.

Représentant les variations des protides, des lipides et de l'amylase dans le plasma de l'Astacus fluviatilis en période de mue.



VI. Variations provoquées par la mue chez d'autres crustacés décapodes

Le peu de temps dont nous disposions à la Station Biologique de Roscoff ne nous a malheureusement pas permis de voir si les crustacés décapodes marins subissaient, au moment de la mue, des modifications aussi importantes dans la composition de leur liquide intérieur, que l'Astacus.

Pourtant des exemplaires isolés de Maïas en train de muer, ainsi que certaines observations faites chez *Cancer pagurus* ou *Carcinus mænas*, nous permettent de croire que tous les crustacés décapodes présentent, au moment de la mue, des variations considérables dans la composition du liquide intérieur.

Maïa squinado.

Le liquide intérieur des Maïas est en général plus pauvre en substances protéiques coagulables par la chaleur que celui de l'Astacus.

Il contient en moyenne *1,52 gr. %* de protéines coagulables par la chaleur, représentées en majorité par une globuline qui précipite à 50 % de saturation par le sulfate d'ammonium, l'hémocyanine et le fibrinogène n'existant qu'en très petites quantités (fibrinogène, 0,02 %, et hémocyanine, 0,10 %).

Pourtant au mois d'août, dans la période de mue, nous avons trouvé des exemplaires dont le sang était beaucoup plus riche en protéines coagulables par la chaleur (*3,55 gr. %* centimètres cubes). L'augmentation portait surtout sur la fraction pseudo-globuline (3,02 gr. %). Il y avait pourtant une élévation évidente du taux du fibrinogène (0,44 %), ainsi que de l'hémocyanine (0,40 %).

Le liquide intérieur des mêmes animaux avait un pouvoir coagulant beaucoup plus marqué, comme nous l'avons déjà signalé dans le chapitre de la coagulation.

Des Maïas ayant mué, dont la carapace était incomplètement calcifiée, avaient par contre un sang pauvre en substances protéiques coagulables par la chaleur. *Protéines totales*, 0,30-1,10 gr. pour 100 centimètres cubes; *pseudo-globulines*, 0,30-0,92 gr. %; fibrinogène absent; hémocyanine trace à 0,18 gr. %.

Les albumoses et les peptones sont absentes du sang des Maïas. Par la méthode de Fosse, nous avons trouvé des traces d'urée, 0,0365 gr. pour 1000 centimètres cubes de sang.

CANCER PAGURUS.

Le sang du tourteau contient en moyenne 3 à 4 grammes de protéines coagulables par la chaleur dans 100 centimètres cubes.

Il nous est arrivé pourtant de trouver, dans la période de mue chez un animal mâle de grande taille (diam., 25 × 15), un liquide intérieur intensément coloré en rose qui bleuissait au contact de l'air. Il contenait 8 grammes de protéines coagulables par la chaleur pour 100 centimètres cubes.

A la même époque, une femelle presqu'aussi grande (diam., 15 × 10), saignée le même jour, avait un liquide intérieur qui ne contenait que 0,34 gr. de protéines coagulables par la chaleur pour 100 centimètres cubes.

Les observations faites chez l'Astacus nous permettent de supposer que ces différences sont probablement dues au fait que le mâle était examiné avant la chute de sa carapace, et la femelle après la consolidation de la nouvelle carapace.

CARCINUS MÆNAS.

Le plasma des crabes qui approchent de la mue est coloré, comme chez l'Astacus, en rose ou rose orangé; il présente la deuxième phase de la coagulation plus accentuée que chez les normaux; on observe, chez les Maïas, une gélification de toute la masse sanguine avec la formation d'un caillot semi-fluide. A cette même époque, l'enrichissement en protéines coagulables par la chaleur est évident.

Voici un tableau qui résume comparativement les chiffres représentant le taux des substances protéiques chez le crabe en dehors et au voisinage de la mue.

	Crabes éloignés de la mue	Crabes au voisinage de la mue
	Chiffres moyens, grammes pour 100 cc.	
Albumines totales coagulables à 100°	2,20	5,3
Hémocyanine	0,72	2,17
Globulines	0,67	2,83
Pseudoglobulines	0,31	2,13
Fibrinogène	0,50	0,70
Viscosité	1,35	1,35

Absence chez Carcinus mænas, comme chez l'Astacus, d'albumoses et de peptones.

QUATRIÈME PARTIE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU PHÉNOMÈNE DE LA CALCIFICATION

Essais d'interprétation du mécanisme de la calcification.

La calcification, c'est-à-dire l'imprégnation de certains tissus par les sels insolubles de chaux, est un processus qui a attiré l'attention de nombreux expérimentateurs et donné lieu à de multiples recherches. L'intérêt de cette question a augmenté par le fait qu'en dehors de la calcification physiologique existait aussi une calcification pathologique.

Comment expliquer en effet l'apparition de dépôts calcaires dans des organes qui n'en contiennent pas habituellement; comment expliquer surtout l'incapacité de se consolider des tissus qui, à l'état normal, fixent et précipitent facilement les sels de chaux ?

L'analyse a montré que le résidu minéral des os est formé, chez les mammifères, presqu'exclusivement par du phosphate et du carbonate de calcium et de magnésium. Ces sels se trouvent dans l'os d'après Wells, Meyer et Wells, dans les proportions suivantes :

$Ca_3 (PO_4)_2$	86
$Ca\ CO_3$	12
$Mg_3 (PO_4)_2$	1

Les ions Ca, PO_4 et CO_3 existeraient dans l'os, selon Werner et Grossmann, sous la forme d'un complexe du type de l'hydroxyapatite :

$$Ca_3\ P_2\ O_8 Ca_3 \quad Ca\ (OH)_2.$$

La calcification pathologique est, d'après Wells, quant au résidu minéral, identique à la calcification physiologique.

R. Klement a montré enfin que la composition du résidu minéral de *l'os jeune* est relativement différente de celle de l'os vieux.

Os jeune		Os vieux	
$Ca_3 (PO_4)_2$	52,7	$Ca_3 (PO_4)_2$	86
$Ca (OH)_2$	5,20	$Ca CO_3$	12
$Ca CO_3$	2,30	$Mg_2 (PO_4)_2$	1

Si les auteurs sont à peu près du même avis lorsqu'il s'agit de la composition du résidu minéral des os, les opinions diffèrent beaucoup dans l'interprétation des causes qui provoquent la concentration et surtout la précipitation des sels de chaux dans le tissu ostéoïde.

Hofmeister est d'avis que la calcification est due à une modification du *p*H. Dans un milieu riche en CO_2 le tissu se charge de sels de chaux; à la suite d'une perte de CO_2 se traduisant *par une alcalinisation du milieu,* les sels de chaux devenus insolubles précipitent de leur solution.

Rapkine et Prenant, dans un travail relativement récent, semblent confirmer cette hypothèse, car, en étudiant les variations du *p*H dans le liquide blastocœlien de Paracentrotus lividus Lamarck, au cours du développement des larves, ils constatent que, « dans la blustula et jusqu'à la formation du mésenchyme primaire, le *p*H reste constant (7 à 7,3). A partir de la formation du mésenchyme, au début de la gastrulation, il s'élève brusquement (en 6 heures environ) jusqu'à *p*H 8 ; puis, plus lentement (en une dizaine d'heures), jusqu'à *p*H 8,5. C'est au moment où il a atteint 8 qu'apparaissent les premières spicules calcaires. Une fois monté à 8,5, le *p*H reste constant pendant cinq heures environ, puis redescend, en vingt-quatre heures à peu près, à sa valeur initiale ».

Pour ces auteurs, il est clair que la montée et la descente de la courbe du *p*H sont en rapport avec le dépôt calcaire. Ils expliquent ce phénomène par l'apparition des cellules du mésenchyme qui, en absorbant le gaz carbonique, provoquent l'élévation du *p*H, l'équilibre se rétablissant par la précipitation du calcium, qui se trouve en solution dans le liquide blastocœlien.

Pfaundler croit que le tissu ostéoïde a une grande affinité pour les sels de chaux, avec lesquels il forme une combinaison soluble. Lorsqu'intervient une cause quelconque capable de rompre l'équilibre, la combinaison se défait et les sels de chaux se précipitent.

La théorie de Klotz, suivant laquelle la calcification serait due à la formation de savons de chaux insolubles, a été contestée par Baldauf et Wells.

En introduisant des fragments de différents tissus préalable-

ment stérilisés dans la cavité péritonéale des cobayes, Wells observe que les fragments se chargent de sels de chaux solubles. C'est le cartilage qui semble avoir la plus grande affinité pour les sels de calcium, de strontium et de baryum; cette affinité est beaucoup plus accentuée chez les cartilages se consolidant physiologiquement que chez le cartilage trachéal, par exemple.

Cette observation a conduit Wells à admettre que la calcification était due *en premier* aux propriétés physico-chimiques spéciales du cartilage qui font qu'il est capable d'absorber, de fixer et de concentrer les sels solubles de chaux.

Tous les tissus qui, par la suite d'une modification quelconque de l'équilibre colloïdal de leur protoplasma, ont subi un début de coagulation (c'est-à-dire une espèce de mort locale), sont susceptibles de s'enrichir tout comme le cartilage en sels de chaux solubles.

Lichwitz explique l'enrichissement du tissu ostéoïde en sels de chaux de la manière suivante : le tissu ostéoïde, avide de sels de chaux solubles, les absorbe par osmose des liquides environnants en formant des solutions saturées en sels de chaux. A la suite d'une cause quelconque, les sels de chaux précipitent brusquement de ces solutions saturées. Le tissu ostéoïde redevient apte à fixer de nouvelles quantités de sels solubles de chaux. Nouvelle précipitation, nouvelle absorption, et ainsi de suite jusqu'à saturation complète du tissu ostéoïde par les sels de chaux.

Pauli et Samec ont pu démontrer que les substances protéiques augmentent la solubilité du phosphate et du carbonate de calcium. L'affinité du cartilage pour les sels solubles de chaux serait due à sa richesse en protéines.

Freudenberg et Gyorgy s'expliquent le processus de la calcification par la formation d'une combinaison entre les substances protéiques et les sels solubles de chaux. Cette combinaison fixe facilement le phosphore et l'acide carbonique. Il se produit de la sorte du phosphate ou du carbonate d'albumine et de calcium, complexe excessivement instable qui se décompose en carbonate ou phosphate insoluble de chaux, et en protéines. Ces derniers fixent de nouveau les sels solubles de calcium et respectivement du CO_2 ou du phosphore. Suivant ce mécanisme devraient se calcifier tous les tissus, s'il n'existait pas des substances qui empêchent le calcium de se combiner avec les protéines. Freudenberg et Gyorgy croient qu'en général les produits du métabolisme cellulaire ne favorisent pas la calcification, de la sorte que tout tissu

vivant dont le métabolisme est normal, ne peut pas fixer et précipiter les sels de chaux.

Cette théorie a été vivement combattue; Klinke admet qu'il ne s'agit pas d'une combinaison entre les sels de calcium et les protéines, mais plutôt d'une absorption à la surface des molécules protéiques de sels de calcium non dissociés.

Dans une série de travaux extrêmement intéressants, Robison a pu montrer qu'il existait dans le cartilage un ferment capable de libérer le phosphore de ses combinaisons organiques (éthers phosphoriques). Ce ferment, qu'il appelle *phosphatase,* présente un maximum d'activité à *p*H 8,5. Hummel ayant trouvé que le *p*H du tissu ostéoïde varie entre 7,5 et 8,5, il est probable que le phosphore mis en liberté par la phosphatase précipite le calcium de ses solutions au sein du tissu devant se calcifier.

Schwartz, Eden et Hermann ont constaté d'ailleurs que le cal osseux est plus riche en phosphore que le cartilage :

$$\frac{Ca}{P} = \frac{1}{0.4} \text{ cartilage ; } \frac{Ca}{P} = \frac{1}{0,6} \text{ os.}$$

De toutes ces théories et hypothèses, un fait semble se dégager incontestablement ; c'est que, dans le processus de la calcification, un des facteurs les plus importants est la propriété que possède le cartilage ou le tissu ostéoïde d'absorber un excès de sels de chaux solubles.

Quant à la précipitation des sels de chaux, le problème n'est pas encore résolu. S'agit-il d'une simple modification de *p*H ? Doit-on admettre sans contestation la théorie de la phosphatase de Robison ? ou bien l'organisme est-il capable d'élaborer à un moment donné un ferment qui provoque la précipitation des sels de chaux ?

Imbert et Guyot, en utilisant dans le traitement des consolidations retardées, le premier du sérum sanguin de blessés présentant des fractures en évolution et non consolidées, le deuxième du sérum sanguin de convalescents de fractures osseuses, obtiennent des guérisons surprenantes par leur rapidité dans des cas où une ou plusieurs interventions chirurgicales étaient restées inefficaces.

Pour expliquer ces résultats, Imbert suppose que le sang d'un fracturé en voie de consolidation doit renfermer à certaines périodes une diastase semblable aux diastases cellulaires qui serait produite par le foyer de fracture lui-même et versée par lui dans la circulation. Cette diastase existerait d'après l'auteur

dans les glandes endocrines qui sécréteraient à leur tour une substance capable de stimuler la consolidation du tissu ostéoïde. Le sang serait donc, chez un individu en train de guérir une fracture osseuse, porteur, à tour de rôle, d'une diastase et d'une substance ostéoformative.

Une expérience personnelle ayant permis au professeur J. Cantacuzène de vérifier l'efficacité du traitement des fractures à consolidation retardée par le sérum des malades et convalescents de fractures osseuses, il nous a vivement engagé à étudier le processus de la calcification chez l'Astacus en premier, chez les animaux et malades atteints de fractures, ensuite.

Comme nous l'avons déjà dit dans l'un des chapitres précédents, une écrevisse de grande taille mue en général deux fois chaque année.

Après l'abandon de l'ancienne carapace, la nouvelle qui est tout à fait molle, se consolide avec une rapidité étonnante; au bout de vingt-quatre à trente-six heures, le processus de calcification est complètement terminé. La rapidité du phénomène, ainsi que la possibilité de nous procurer et de conserver des écrevisses en grand nombre dans les bacs à eau courante du laboratoire, nous offraient des conditions excellentes pour le début de nos recherches.

En sacrifiant des Astacus à différents moments, avant et après la chute de leur carapace, nous avons pu constater les faits suivants :

En dehors de la période de mue, les écrevisses ne possèdent jamais de réserves calcaires; dix à douze jours avant la perte de leur ancienne carapace, on voit apparaître au-dessus de la cuticule, dans le sac cardiaque, de tout petits disques blancs et durs formés d'anneaux concentriques.

Le début de la formation des gastrolithes coïncide avec une coloration du plasma, une élévation de l'indice réfractométrique et une augmentation du taux des protéines coagulables par la chaleur. Lorsque le taux de ces dernières arrive à un maximum (8 à 9 grammes pour 100 centimètres cubes de sang) et que la réserve calcaire a atteint 7 à 8 millimètres de diamètre, l'animal se prépare à sortir de sa carapace. Il s'isole de ses congénères, ne mange plus, reste immobile et l'on voit bientôt apparaître des fentes le long de la carapace des deuxièmes articulations des pattes, ainsi qu'entre le thorax et l'abdomen.

Sous l'apparence d'une immobilité complète, interrompue seulement de temps en temps par de légers soubresauts, l'animal

dégage doucement ses pattes et son céphalo-thorax. L'ancienne carapace semble se décolorer; en réalité, elle se décolle et, si on la soulève avec soin, on constate qu'une couche d'aspect gélatineux s'est interposée entre l'ancienne et la nouvelle carapace. Ce processus dure deux à trois heures, puis brusquement, à la suite de plusieurs secousses énergiques, l'animal dégage d'abord ses grosses pinces et en dernier son abdomen. Il quitte l'ancienne carapace comme s'il quittait un gant et, une fois libre, il se meut extrêmement vite et ne diffère des écrevisses qui n'ont pas mué que parce qu'il est mou et plus intensément coloré. La couche gélatineuse qui l'enveloppait est restée à l'intérieur de l'ancienne carapace. Comme au début elle est encore semi-fluide, on peut la recueillir facilement dans un vase quelconque. Après agitation, on constate que ce gel se sépare en deux fractions :

1° Un liquide incolore qui ne donne après évaporation qu'un résidu négligeable, et 2° une masse translucide qui se contracte et surnage à la surface du liquide.

Cette masse n'est soluble que dans les solutions concentrées d'acides et de bases et ne réduit pas la liqueur cuprique après hydrolyse. Si on laisse ce même gel à l'intérieur de l'ancienne carapace, au bout d'un temps assez court, le liquide disparaît en ne laissant subsister qu'une mince pellicule translucide. Ces caractères nous font croire que, par un mécanisme quelconque, une partie du fibrinogène, accumulée dans le plasma de l'écrevisse avant la mue, passe à travers la nouvelle enveloppe chitineuse afin que, par sa gélification, il facilite le décollement de l'ancienne carapace.

L'écrevisse qui vient de muer est complètement molle. Si on la sacrifie à ce moment, on trouve les réserves calcaires intactes à l'intérieur de son estomac. Le taux des protéines a baissé considérablement; pourtant, le sang est encore fortement coagulable.

Quelques heures plus tard, lorsque la carapace commence à durcir, les gastrolithes ont beaucoup diminué, et enfin lorsque le processus de la calcification est terminé, il n'existe plus trace de réserve calcaire dans l'estomac. En sacrifiant des écrevisses à différents moments de leur consolidation, nous avons pu trouver des gastrolithes de toutes les dimensions (5, 4 et 2 millimètres de diamètre).

Quelle est maintenant la composition de ces gastrolithes ?

En les immergeant dans une solution d'acide acétique (Dubosq-Brazil), nous avons pu éloigner complètement les sels de chaux après un séjour de quarante-huit à soixante-douze heures.

Il reste alors une masse relativement dure, d'aspect corneux, qui retient mal les colorants habituels. Elle est formée de fins anneaux concentriques, d'aspect amorphe. Seule la couche la plus éloignée du centre garde les traces d'une organisation cellulaire, car elle contient de place en place de nombreuses cellules qui se colorent fortement par le bleu de méthylène.

L'analyse chimique des gastrolithes nous a permis de constater que leur composition était la suivante :

Eau	12,9 %	gr. de	réserve calcaire
Substances organiques	9,5	—	—
Cendres	77,6	—	—
Calcium	31,6	—	—
Phosphore	0,65	—	—
Magnésium	0,43	—	—
CO_2 (provenant du $CaCO_3$).	33,8	—	—

Le résidu minéral est formé presque en totalité par du carbonate de calcium; pour *100 grammes de cendres*, on a :

96,5 %	$CaCO_3$
1,5 %	$Ca_3(PO_4)_2$
2 %	$Mg_3(PO_4)_2$

$$\frac{Ca\,CO_3}{Ca_3(PO_4)_2} = \frac{96,5}{1,5} = 463.,$$

$$\frac{Ca_3(PO_4)_2}{Ca\,CO_3} = \frac{1.5}{96,5} = 0,015.$$

L'analyse de la carapace (débarrassée, par décollement, de l'épiderme et du derme sous-jacent), nous a montré qu'elle était composée de :

Eau	42,2 %	gr. de	carapace
Substances organiques	27,8	—	—
Cendres	30	—	—
Calcium	20,4	—	—
Phosphore	0,80	—	—
Magnésium	0,34	—	—
CO_2 (provenant du $CaCO_3$)	10,5	—	—

Le résidu minéral de la carapace est lui aussi formé en majorité par du carbonate de calcium; pourtant, les quantités correspondantes de phosphate, de calcium et de magnésium, pour *100 grammes de cendres*, sont nettement plus élevées, comme il ressort du tableau suivant :

77,6 %	$CaCO_3$
18,4 %	$Ca_3(PO_4)_2$
4 %	$Mg_3(PO_4)_2$

$$\frac{Ca\ CO_3}{Ca_3\ (PO_4)_2} = \frac{77,6}{18,4} = 4,3.$$

$$\frac{Ca_3\ (PO_4)_2}{Ca\ CO_3} = \frac{18,4}{77,6} = 0,23.$$

Rappelons ici que le résidu minéral de l'os des mammifères est représenté en majorité par du phosphate de calcium, sa composition étant la suivante :

12 % ..... $CaCO_3$
86 % ..... $Ca_3\ (PO_4)_2$
1 % ..... $Mg_2\ (PO_4)_2$

$$\frac{Ca\ CO_3}{Ca_3\ (PO_4)_2} = \frac{12}{86} = 0,14.$$

$$\frac{Ca_3\ (PO_4)_2}{Ca\ CO_3} = \frac{86}{12} = 7,16.$$

En comparant les rapports du carbonate de calcium au phosphate de calcium et réciproquement du phosphate de calcium au carbonate de calcium, dans les gastrolithes et la carapace de l'Astacus et dans les os des mammifères, on a :

	Astacus		Mammifères
	gastrolithes	carapace	os
$\frac{CaCO_3}{Ca_3\ (PO_4)_2}$	64,3	4,3	0,14
$\frac{Ca_3\ (PO_4)_2}{CaCO_3}$	0,015	0,23	7,16
	excès de carbonates		excès de phosphates

Nous insistons sur cette différence, parce que si chez les mammifères, où la grande majorité du calcium se trouve précipité sous forme de phosphate tricalcique, la formation de l'os peut être attribuée à la libération du phosphore des éthers phosphoriques par la phosphotase de Robison, chez l'Astacus elle ne peut avoir aucun rôle dans la formation des gastrolithes et un rôle tout à fait insignifiant dans la consolidation de la carapace. Les gastrolithes sont formés presqu'en totalité par du carbonate de calcium et la carapace, elle-même, contient un grand excès de carbonate de calcium.

Quelle est la cause de la précipitation des sels de calcium dans la carapace de l'Astacus ? S'agit-il d'une modification de *p*H ? S'agit-il d'apparition dans la membrane devant se consolider

d'éléments cellulaires capables de fixer le CO_2, selon l'hypothèse de Prenant et de Rapkine ? S'agit-il enfin d'une substance (ferment ?) soluble dans le plasma, favorisant la précipitation de calcium aussitôt que son taux dépasse certaines limites ?

Pour tâcher de répondre à ces différentes hypothèses, nous nous sommes proposé d'étudier :

1° *Les variations du* pH, de la *réserve alcaline,* du *calcium,* du *magnésium* et du *phosphore* dans le PLASMA et dans le CONTENU STOMACAL de l'Astacus deux mois avant la chute de la carapace, immédiatement avant la chute de la carapace, immédiatement après la chute de la carapace, après le début de la consolidation et après consolidation complète.

2° *Les modifications cytologiques* éventuelles de la membrane d'écrevisse au moment de la mue.

3° L'action précipitante *in vitro* du plasma d'écrevisse en période de mue sur la solution d'un sel soluble de calcium.

1° L'étude des variations des différents éléments nous a montré que :

a) Le pH du sang de l'Astacus à l'état normal varie entre *7,7 et 7,8.* Pendant la période de consolidation, il s'élève à des valeurs égales à *8,2-8,3.*

Le pH du contenu stomacal se maintient aussi bien en temps normal qu'au moment de la mue, entre 5,4 et 5,6.

b) LA RÉSERVE ALCALINE du *sang* d'écrevisse varie, à l'état normal, entre *36,4* et *37,2* centimètres cubes de CO_2 (à 0° et 760 millimètres de pression) pour 100 centimètres cubes de sang.

Elle augmente à l'approche de la mue, atteint les plus grandes valeurs immédiatement avant la mue, *67,2-64,9* centimètres cubes de CO_2 % centimètres cubes de sang; baisse immédiatement après la chute de la carapace à des valeurs allant de *44,3 à 48,1,* et revient complètement aux valeurs normales deux mois après la calcification.

La réserve alcaline *du contenu stomacal* est, aussi bien en temps normal qu'en temps de mue, extrêmement faible ; elle varie entre *10,7 et 14,7* centimètres cubes de CO_2 % centimètres cubes de contenu stomacal.

c) Le taux du calcium varie *dans le sang* de l'Astacus, à l'état normal, entre *40 et 43* milligrammes pour 100 centimètres cubes. Pendant la période de mue, il s'élève et s'abaisse alternativement en oscillant entre *36 et 50 milligrammes* pour 100 centimètres cubes, aussi bien avant la chute de la carapace (pendant la forma-

tion des gastrolithes) qu'après la chute de la carapace (pendant la consolidation de la nouvelle carapace). Nous avons trouvé le chiffre le plus élevé, *68 milligrammes %*, dans le sang d'une écrevisse, immédiatement avant la chute de la carapace. Le sang semble bien, comme nous le disions dans le chapitre précédent, n'être chez l'Astacus qu'un vecteur qui transporte le calcium, au fur et à mesure des nécessités, vers les endroits devant se consolider.

Le calcium soluble dans le *suc stomacal* varie, en temps normal, entre des limites assez approchées de celle du sang. Il s'élève, par contre, dans la période de calcification, jusqu'à *200 milligrammes* pour 100 centimètres cubes.

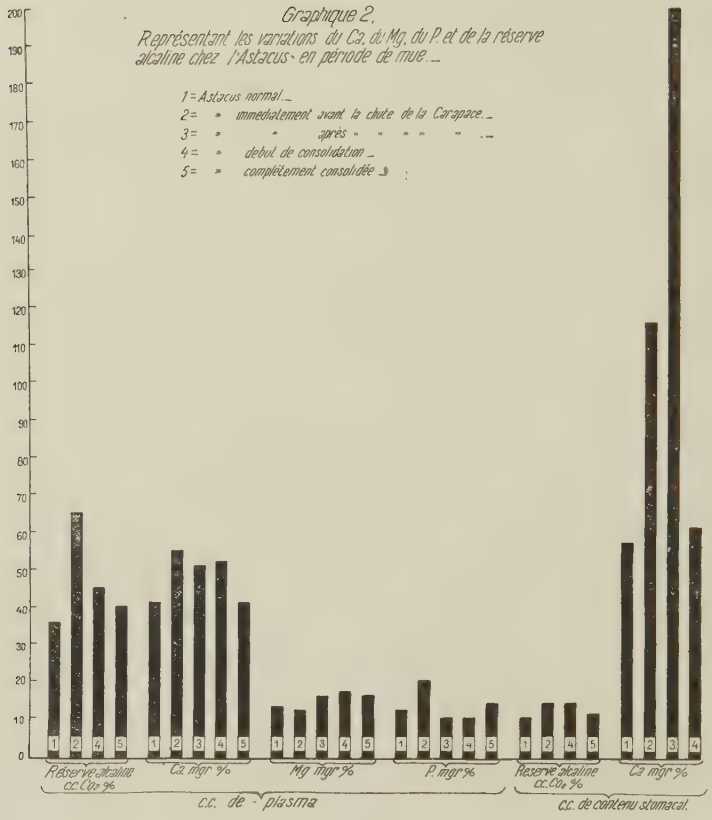
d) Le taux *du magnésium* trouvé dans le sang de l'Astacus normal est beaucoup plus bas que celui du calcium. Il varie entre *12,8 et 14 milligrammes* par 100 centimètres cubes. Il s'élève légèrement pendant la consolidation de la nouvelle carapace et se maintient entre *15 et 18 milligrammes*, jusqu'à consolidation complète.

e) Le phosphore du sang d'Astacus ne présente pas de modifications importantes pendant la période de mue; variant en temps normal entre 13 et 21 milligrammes pour 100 centimètres cubes de sang, il se maintient, pendant la consolidation, entre 10 et 12 milligrammes pour 100.

TABLEAU *résumant les variations de la réserve alcaline, du* Ca, *du* Mg, *et du* P *dans le sang et le contenu stomacal de l'écrevisse en train de muer :*

	Plasma					Contenu stomacal		
			Ca, Mg, P					
	*p*H	Réserve alcaline, cc. CO_2 %	mmgr. % cc. de plasma			*p*H	Réserve alcaline, cc. CO_2 %	Mmgr. calcium %
Normal	7,7-7,8	36,4-37,2	40,43	114	12,9	—	10,7	58
Immédiatement av. la chute de la carapace...	7,7-7,8	67,2-64,9	44,4-68	12,8	21	5,6	14,7	62
Immédiatement apr. la chute de la carapace...	8,1-8,2	44,3-48,1	48-56	15-17	10-12	5,6	14,7	117,2
Début de consolidation ...	7,7-7,8	— —	47-59	18	11	5,6	—	200
Consolidation terminée	7,7-7,8	40,6	42	17	14,7	—	12	—

GRAPHIQUES *représentant les variations de la réserve alcaline, du calcium, du magnésium et du phosphore dans le sang et le contenu stomacal de l'Astacus à la mue :*


Graphique 2.
Représentant les variations du Ca, du Mg, du P et de la réserve alcaline chez l'Astacus en période de mue.
1 = Astacus normal
2 = » immédiatement avant la chute de la Carapace
3 = » » après » » » » »
4 = » début de consolidation
5 = » complètement consolidée
Réserve alcaline cc. Co2 %
Ca. mgr. %
Mg. mgr %
P. mgr %
Reserve alcaline cc. Co2 %
Ca mgr %
c.c. de plasma
cc. de contenu stomacal

2° Modifications cytologiques qui se produisent dans le tégument de l'Astacus au moment de la mue.

La structure normale du tégument des crustacés décapodes et ses modifications au cours de la mue n'ont guère été étudiées depuis les travaux déjà anciens de Vitzou.

Nous avons repris ce travail surtout dans l'intention de poursuivre le transport des sels de calcium vers la nouvelle carapace, et de voir s'il y a des modifications cytologiques importantes qui précèdent ou accompagnent la précipitation de sels de chaux dans la cuticule.

Pour réaliser cette étude, nous nous sommes servi de la technique suivante :

Fixation. — a) *Dubosq-Brazil* : 150 centimètres cubes d'alcool 80° + 1 gramme d'acide picrique + 60 centimètres cubes de formol à 40 % + 15 grammes d'acide acétique cristallisable *pour l'étude cytologique.*

b) *Alcool 90°* additionné de *10 % de formol* du commerce préalablement neutralisé *pour suivre la précipitation des sels de chaux dans la nouvelle carapace.*

Inclusion à la paraffine; coupes de 5 à 6 micra.

Coloration. — a) *Hæmotoxyline-éosine* pour l'étude cytologique.

b) *Méthode de Grandi et Mainini* (pour l'étude de la déposition des sels de chaux insolubles) que nous décrirons brièvement.

Après fixation à l'alcool formolé neutre, inclusion dans la paraffine sans passage par l'eau. Après élimination de la paraffine et du toluol, les coupes sont immergées dans une solution saturée de *purpurine* dans l'alcool à 90°. Après une heure environ, on les immerge dans une solution à 8 ‰ de chlorure de sodium. En présence de sels de calcium insolubles, le chlorure de sodium précipite la purpurine. Lavage à l'alcool à 70°, jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de petits nuages de couleur. Double coloration, si l'on veut, au bleu de méthylène.

Résultats : toute la préparation apparaît colorée en bleu, seuls les endroits où existent des sels de calcium précipités sont fortement colorés en rouge.

Téguments de l'Astacus à l'état normal (fig. 1).

A l'état normal, les téguments de l'Astacus comprennent essentiellement, en allant de l'extérieur vers la profondeur, la série de couches suivante :

1° *La cuticule chitineuse* composée elle-même de plusieurs couches :

a) Une pellicule incolore.

b) Une cuticule éosinophile sans structure apparente.

c) Une couche plus profonde comprenant environ les 4/5 de l'épaisseur totale de la cuticule de structure lamelliforme, et présentant en outre une striation transversale en palissade. Celle-ci se divise à son tour en trois portions : une première se colorant intensément, mais assez irrégulièrement en violacé; une

deuxième formée de 8 à 9 lamelles plus lâches se colorant en rose, et enfin la troisième qui ne diffère de la deuxième que par le fait que sa structure lamellaire est beaucoup plus dense.

d) Une couche profonde, immédiatement superposée à l'épithélium de structure lamelliforme, à lamelles parallèles à la surface, et *dépourvue de striations transversales.*

2° *Un épithélium* composé de cellules de petites dimensions, de formes assez irrégulières à cytoplasma *très peu* vacuolaire. Très compact, très dense, non lacunaire.

3° *Un tissu conjonctif* assez dense (derme), au sein duquel sont creusées un certain nombre de lacunes sanguines.

4° *Une fine cuticule chitineuse* interne sous-jacente à un mince endothélium qui délimite la face profonde du derme.

On observe, de place en place, des piliers cellulaires transversaux, interposés entre les deux cuticules (extérieure et intérieure), ayant la forme de deux cônes, opposés par les sommets (piliers en diabolo) et dont le rôle est encore discutable.

Téguments de l'Astacus après la chute de la carapace.

Au moment que se produit la chute de la carapace (fig. 2), *les cellules épithéliales* augmentent rapidement de volume, se gonflent, prenant d'abord un aspect cuboïde, se creusent de vacuoles de plus en plus nombreuses; sous la pression du liquide intravacuolaire, les cellules épithéliales se distendent considérablement dans le sens de la profondeur.

En même temps, les espaces lacunaires du *derme* se remplissent de liquide et finissent par constituer de véritables lacs qui occupent toute l'épaisseur du derme. Jusqu'ici, la portion de la cuticule externe adjacente à l'épithélium à conservé sa structure lamellaire primitive.

A un stade un peu plus avancé (fig. 3), un changement caractéristique se produit dans la structure du cytoplasma épithélial; ce dernier se dispose sous forme de fibrilles denses parallèles entre elles, allant de la superficie vers la profondeur de la cellule; ces fibrilles laissent subsister entre elles une série de canalicules intracellulaires occupant toute la longueur de la cellule. Vers la profondeur, ces canalicules semblent s'ouvrir dans les espaces lacunaires du derme. Vers la surface, ils viennent déboucher à la face profonde de la cuticule lamellaire.

A ce moment, une transformation apparaît au sein de cette

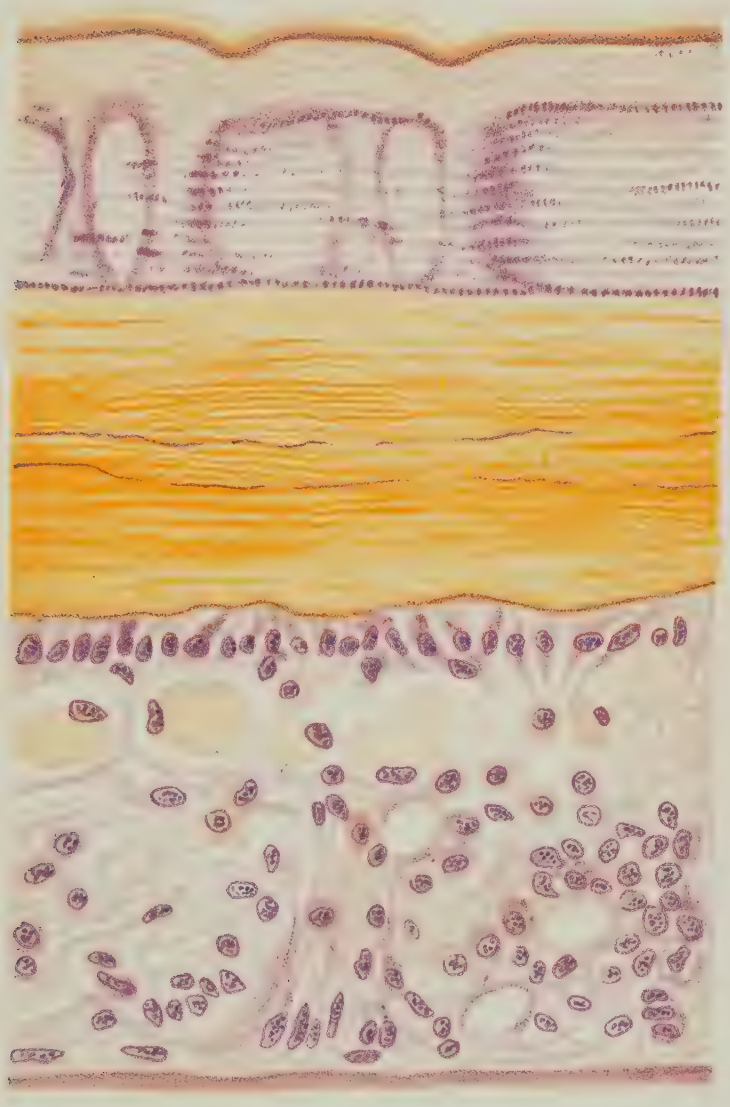


Fig. 1

Imp. Lafontaine, Paris

Boisgontier Dess.

Masson & Cie Editeurs

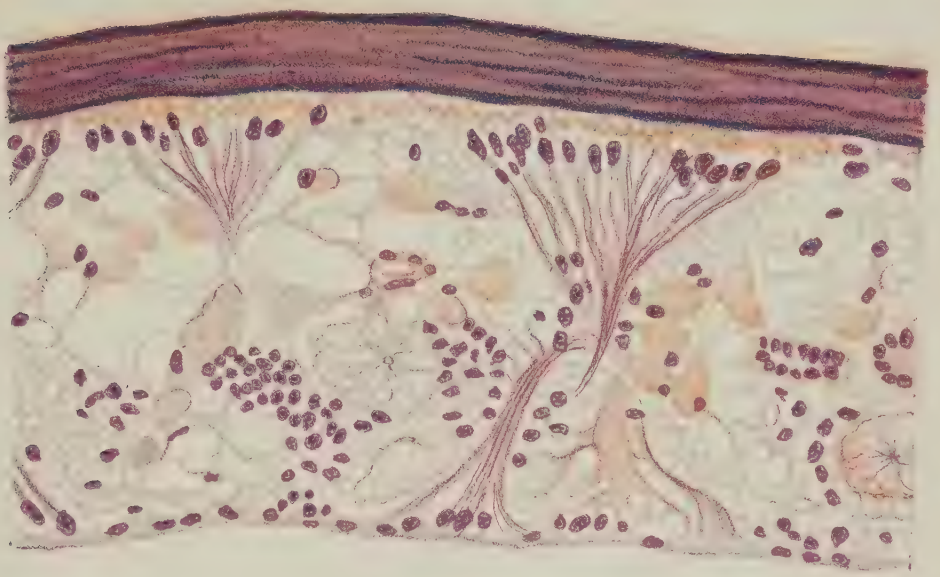
Fig. 2

Fig. 3

Imp. Lafontaine, Paris

Boisgontier-Dess.

Masson & Cie Editeurs



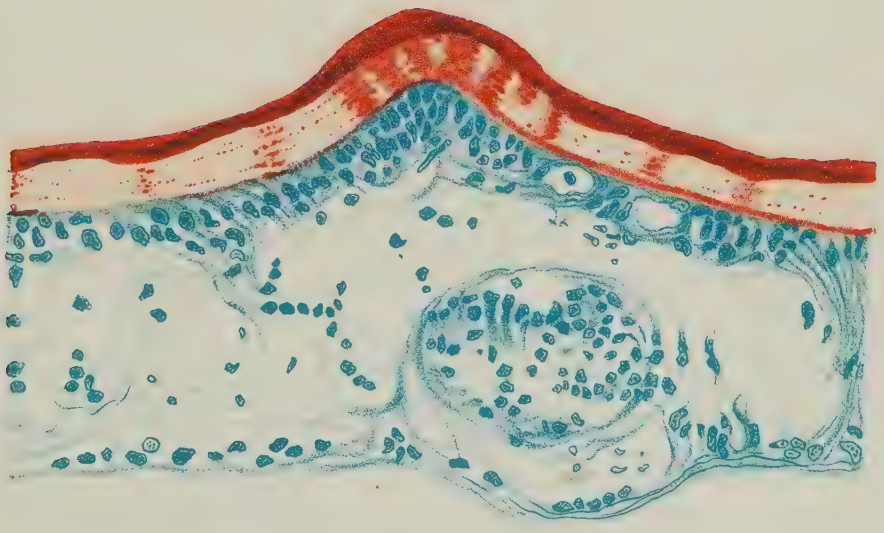


Fig. 5

Imp. Lafontaine, Paris

Boisgontier. Dess

Masson & Cie Editeurs

dernière, sous forme d'une striation transversale absente jusque-là, et identique à celle que nous avons décrite plus haut.

Cette striation en palissade, nouvellement apparue, présente ceci de remarquable que les espaces canaliculés (séparés par des septa) qui la constituent, sont disposés de telle façon que chacun d'entre eux se trouve situé dans le prolongement des canaux épithéliaux, les septa étant situés eux-mêmes en prolongement des fibrilles intracellulaires.

Les cellules qui constituent les colonnades en diabolo participent à la fibrillation générale de l'épithélium aussi bien du côté extérieur que du côté intérieur. En même temps, ces colonnades semblent être beaucoup plus fréquentes dans le tégument de l'Astacus au moment de la mue que dans celui de l'Astacus normal.

On voit de plus apparaître en très grand nombre, dans l'intérieur des vaisseaux sanguins contenus dans le tissu conjonctif, de grands éléments à cytoplasma légèrement éosinophile, appartenant au groupe des néphrocytes de Cuénot.

A ce moment, les gastrolithes sont intactes et la coloration à la purpurine est négative.

A un stade un peu plus avancé (fig. 4), la striation fibrillaire de l'épithélium commence à disparaître, les vacuoles intracellulaires ont tendance à se masser immédiatement sous la cuticule et à former un chapelet de petites vacuoles pressées les unes contre les autres. Les lacunes du tissu conjonctif sont énormes, distendues de liquide et envahies par les grosses cellules ou néphrocytes de Cuénot. Des colorations spéciales (iode $Ca\ Cl_2$) nous ont montré qu'elles étaient chargées de glycogène.

A un stade encore plus avancé (fig. 5), lorsque la réserve calcaire a commencé à diminuer, on voit apparaître, dans la cuticule, une bande colorée en rouge par la purpurine. Le calcium se dépose irrégulièrement en formant deux bandes continues, une plus grosse vers l'extérieur et une deuxième un peu plus mince vers l'intérieur, immédiatement au contact de l'épithélium, et entre elles des colonnes irrégulières qui traversent toute la largeur de la cuticule. L'épithélium a perdu en grande partie sa vacuolisation.

Enfin, au moment où les gastrolithes ont été épuisés, la cuticule apparaît fortement imprégnée de sels insolubles de calcium, et les cellules épithéliales, de même que le derme, ne tardent pas à reprendre leurs dimensions et aspect primitifs.

Il résulte de l'ensemble de ces observations que, pendant les quelques heures qui accompagnent et suivent la chute de l'an-

cienne carapace, les téguments de l'Astacus, c'est-à-dire la nouvelle cuticule, l'épithélium et le derme s'organisent de la sorte qu'une véritable circulation puisse s'établir entre les lacunes du derme d'une part, et les canaux intracellulaires de l'autre. Les sels de chaux à l'état soluble sont transportés par le sang dans les lacunes du derme, et de là puisés par les cellules épithéliales et déversés à l'intérieur de la cuticule chitineuse, par l'intermédiaire des canaux en palissade apparus au sein de cette dernière.

Une dernière question se pose : par quel mécanisme se forment, dans l'intérieur de la couche lamellaire, les canalicules qui prolongent les canalicules intracellulaires et dont elle était privée jusque-là ? Il est permis de supposer qu'un double processus intervient ici : peut-être un processus de ramollissement de la cuticule, grâce auquel vient se surajouter une action de pression mécanique (vis à tergo) provoquée par le courant qui, à travers les canaux intracellulaires, va de la profondeur vers la surface externe.

3° Action précipitante *in vitro* du plasma d'*Astacus fluviatilis* en période de mue sur une solution de chlorure de calcium.

Pour étudier l'action précipitante *in vitro* du plasma d'Astacus sur les sels solubles de calcium, nous avons imaginé la technique suivante :

Une solution de chlorure de calcium à 1 % centimètres cubes était répartie dans des tubes à hémolyse, à raison de 1 centimètre cube pour chaque tube. On y ajoutait une à deux gouttes de sang total d'Astacus, aussitôt après sa sortie du corps (récolté par la ponction d'une des pattes), ou, lorsqu'il nous était possible de récolter de plus grandes quantités de sang, une à deux gouttes de plasma citraté ou du sérum (sang défibriné). On notait, si elle avait lieu, l'apparition instantanée d'un trouble ou la formation d'un précipité au bout de quelques heures.

Voici les observations que nous avons pu faire :

Le plasma d'Astacus normal, ou immédiatement avant la chute de la carapace, *ne trouble jamais* la solution de chlorure de calcium *in vitro*, même si l'on ajoute, à 1 centimètre cube de $Ca\,Cl_2$, un excès, c'est-à-dire cinq à six gouttes de sang, de plasma citraté ou du sérum.

Il en est de même du contenu stomacal.

Par contre, une seule goutte, parfois, du sang d'un Astacus en

train de consolider sa carapace, est suffisante pour troubler fortement la solution de $Ca\,Cl_2$ et provoquer, au bout de quelques heures, la formation d'un abondant précipité *amorphe*.

En saignant toutes les deux heures la même écrevisse, pendant la période de calcification, nous avons constaté que cette propriété précipitante du sang ne se manifestait pas constamment, le phénomène se passait comme si le ferment ou cette propriété précipitante apparaissait et disparaissait de la circulation selon les nécessités de la précipitation ou de la solubilisation du calcium.

Nous avons observé, en plus, que le sang des animaux qui meurent au bout de douze à vingt-quatre heures après la chute de leur carapace, et qui n'arrivent pas à consolider leur nouvelle carapace, *ne trouble jamais* la solution de chlorure de calcium *in vitro*. En sacrifiant les mourants, nous avons eu la surprise de voir qu'ils avaient pourtant épuisé complètement, ou en partie, leurs réserves calcaires. Les sels de chaux avaient donc été solubilisés, transportés vers la cuticule sans pouvoir être précipités. L'incapacité de consolider leur carapace semble bien être due, chez ces animaux, à l'absence dans leur plasma du pouvoir ou du ferment précipitant *in vitro* le $Ca\,Cl_2$.

Comme nous avions constaté que le *p*H du sang d'Astacus s'élève, pendant la consolidation, de 7,8 à 8,1-8,3, et comme nous avions vu en plus qu'à un *p*H égal à 8,4, les sels de chaux qui forment la réserve calcaire sont presque insolubles, nous avons ajouté à la solution de chlorure de calcium *in vitro* des mélanges tampons dont le *p*H variait entre 8,1 et 8,4. Leur action précipitante s'est montrée nulle. L'action précipitante *in vitro* du plasma d'Astacus, sur les sels solubles de calcium, n'est donc pas due à l'élèvement du *p*H qui se manifeste en même temps.

Cette première série d'expériences prouve *que le plasma des écrevisses qui sont en train de consolider leur nouvelle carapace, acquiert* PÉRIODIQUEMENT *la propriété de donner* in vitro *un trouble, suivi de la formation d'un précipité amorphe, avec une solution de* $Ca\,Cl_2$ *à* 1 %.

Peut-on observer un phénomène analogue, pendant la consolidation d'une fracture osseuse, chez les hommes et chez les animaux ? Cette question s'imposait à nous d'autant plus que l'action stimulante du sérum des malades et convalescents de fractures osseuses, dans la guérison des consolidations retardées, avait été signalée par plusieurs auteurs.

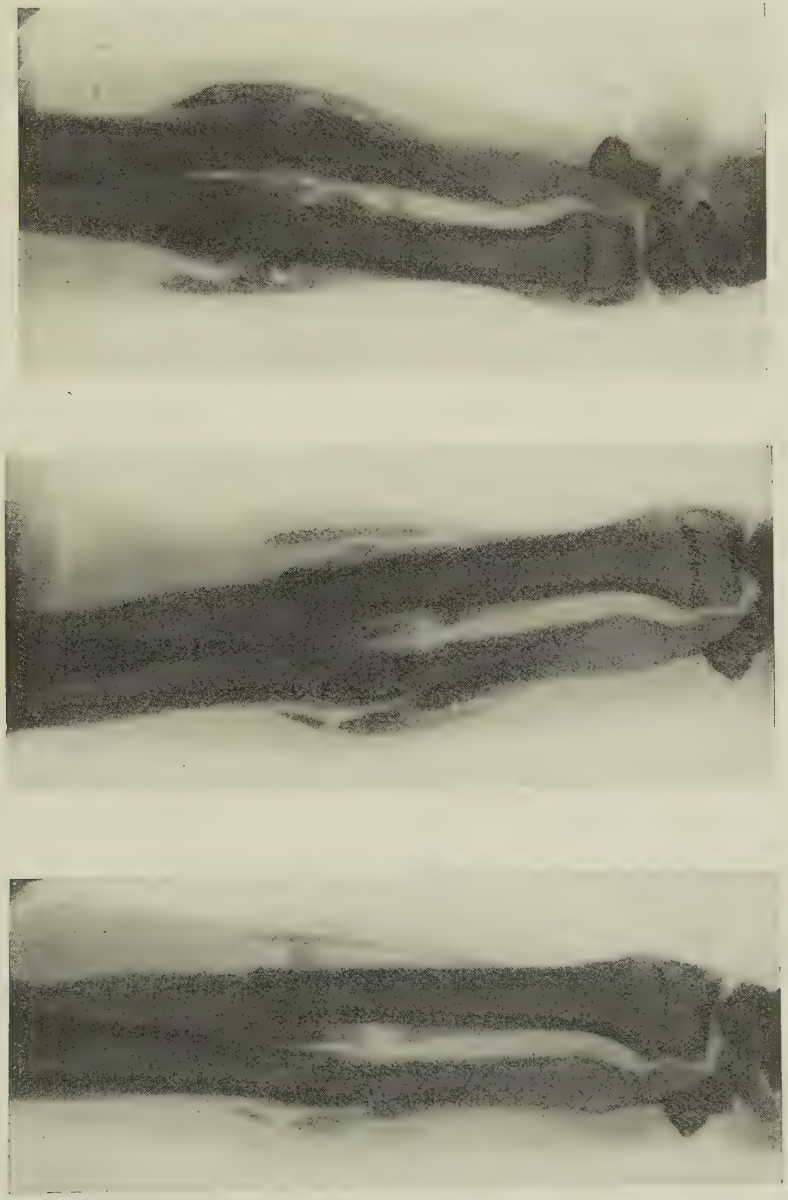
C'est le chien que nous avons choisi comme animal d'expérience.

Deux mâles, relativement jeunes (un à deux ans), ont été saignés préalablement, afin de déterminer la réserve alcaline, ainsi que le contenu en Ca, en Mg et en P de leur plasma. On examinait, en même temps, l'action précipitante du plasma citraté et du sérum sur la solution à 1 % de $CaCl_2$ *in vitro*.

Après légère anesthésie, les *cubitus et radius* droits des mêmes animaux ont été fracturés et les fractures immobilisées avec des attelles. Les malades gardés à vue et nourris normalement furent saignés, toujours à jeun, tous les deux ou trois jours au début, et journellement sept à huit jours après la fracture.

On pratiquait sur le plasma, débarrassé des éléments figurés, le dosage de la réserve alcaline, du calcium, du magnésium et du phosphore, et l'on examinait en même temps son action précipitante sur la solution $CaCl_2$.

L'expérience a duré trente jours. Au bout de ce temps, les animaux avaient repris l'usage des membres blessés, et la radiographie montrait une réelle intensification de la calcification du cal osseux. (Voir page 64.)



Les résultats de nos recherches sont groupés dans le tableau suivant :

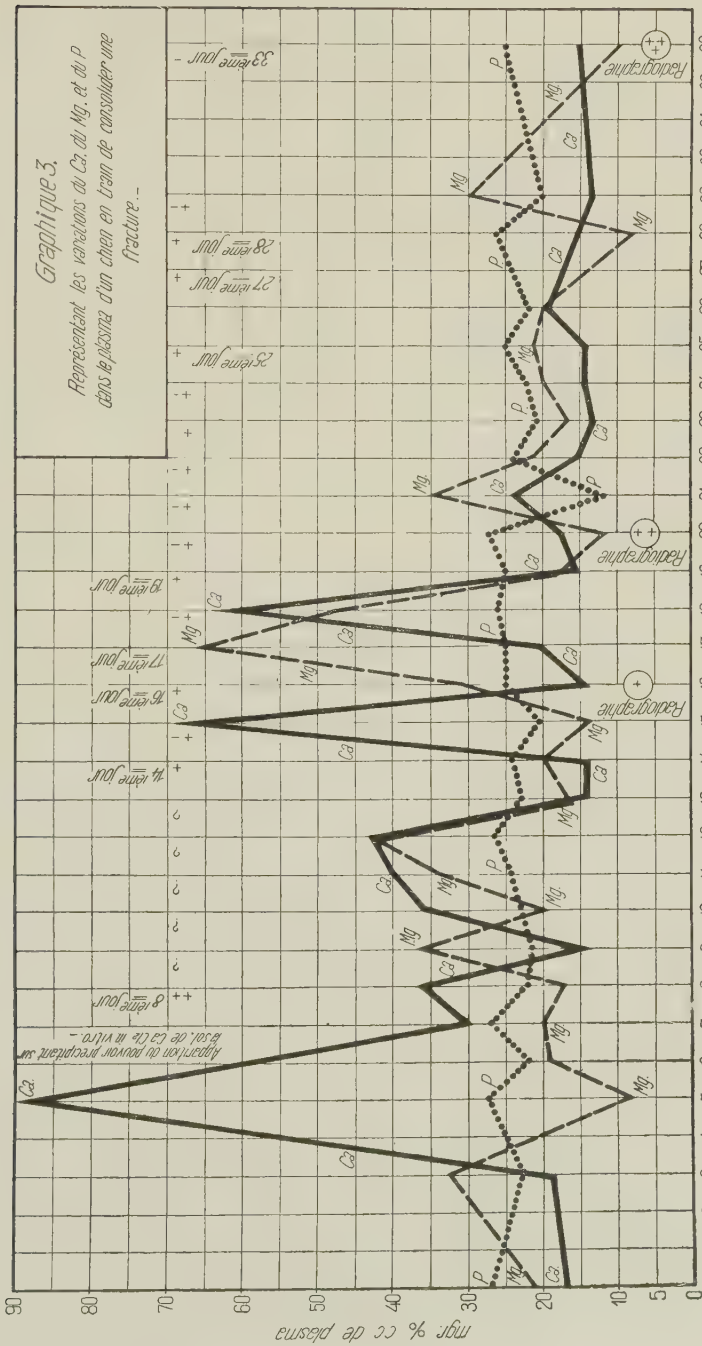
TABLEAU

Ca, Mg, P, *réserve alcaline et pouvoir précipitant du plasma de chien pendant la consolidation d'une fracture osseuse :*

Date de saignée et fracture	Ca, Mg, P (mmgr. 0/0 cc. de plasma)			Réserve alcaline (cc. de Co_2 0/0, cc. de plasma)	Ca×Mg (gr)	Ca×P (gr.)	Ca×Mg×P (gr.)	Pouvoir précipitant sur la solution à 1 0/0 de $CaCl_2$ *in vitro*
9 déc. 1931	17,2	21,7	26,5	33,8	0,37	0,46	1	—
Temps de fracture								
3 jours..	18,4	32,4	22,9	39	0,50	0,41	1,33	—
5 — ..	90	8,5	27,5	42,4	0,76	*2,48*	*2,10*	?
7 — ..	29,6	19,6	22	36,2	0,58	0,65	1,27	?
8 — ..	37,2	17	27	37,8	0,63	1	1,70	++
9 — ..	14	36,7	22	45,7	0,50	0,31	1,14	?
10 — ..	36	19,6	23	37,2	0,71	0,83	1,63	?
11 — ..	40	34,2	24	43,5	1,37	0,96	3,28	?
12 — ..	43	42,7	26,5	37,2	1,84	*1,14*	*4,87*	?
13 — ..	14	17	22,9	48,2	0,24	0,33	0,56	?
14 — ..	14	18,8	24	37,2	0,25	0,34	0,64	+
15 — ..	67	14,5	19,7	39	0,97	1,32	1,91	+—
16 — ..	14,4	31	25	47,5	0,43	0,36	1,13	+ radiogr. (+)
17 — ..	20	66	25	41,9	1,32	0,50	3,30	+
18 — ..	62	48	25,4	41,6	3,02	*1,57*	*7,53*	+—
19 — ..	14,8	17	25	47,5	0,24	0,37	0,63	+
20 — ..	16,8	13	27	41,9	0,21	0,45	0,59	+— radiogr. (++)
21 — ..	24	34,2	12	42,9	0,82	0,53	1,81	+—
22 — ..	15,2	21,3	24	34,6	0,32	0,36	0,77	+—
23 — ..	12,8	17	21	46,5	0,30	0,27	0,44	+—
24 — ..	14	20	21,8	42	0,28	0,31	0,61	+—
25 — ..	14	21	25,4	45,8	0,30	0,36	0,74	+
27 — ..	19,2	20	21,8	38,7	0,38	0,42	0,84	+
28 — ..	13,2	8,5	26,5	40,6	0,11	0,35	0,30	+
29 — ..	13,2	29	20	40,1	0,38	0,26	0,75	+—
33 — ..	15	20	25	—	—	—	—	— radiogr. (+++)

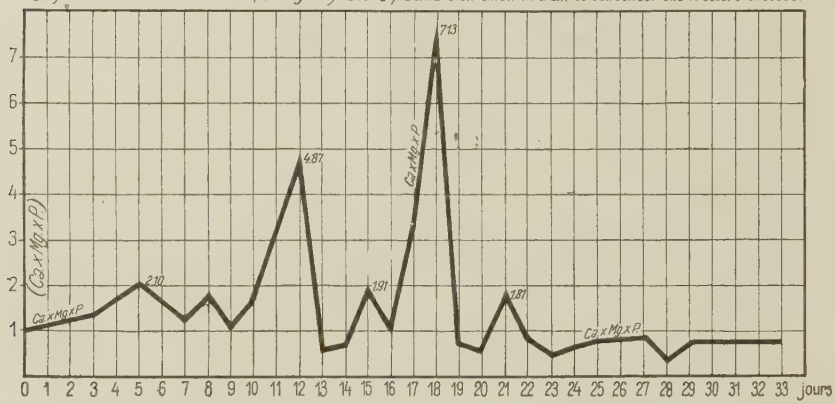
Légende : — absence d'action sur la solution de $CaCl_2$.
? opalescence à peine perceptible.
+— opalescence extrêmement faible.
+ opalescence nette.
++ opalescence immédiate suivie de la formation d'un précipité indosable au bout de quelques heures.

Radiographie : (+) début de précipitation des sels de calcium.
(++) précipitation des sels de calcium intensifiée au niveau du cal osseux.
(+++) précipitation des sels de calcium très intense.


Graphique 3.
Représentant les variations du Ca, du Mg, et du P dans le plasma d'un chien en train de consolider une fracture.
mgr. % cc de plasma
Jours passés après la fracture des os.
Radiographie
Radiographie
Radiographie
Radiographie
8 ième jour
14 ième jour
15 ième jour
17 ième jour
19 ième jour
25 ième jour
27 ième jour
28 ième jour
33 ième jour
Apparition du pouvoir précipitant sur le sol. de Ca Cle in vitro.
Ca
Mg
P

Graphique 4.

Représentant les variations de (Ca × Mg × P) dans le plasma d'un chien en train de consolider une fracture osseuse.



L'examen du tableau et des graphiques qui précèdent nous montre que la quantité d'ions de *calcium* et de *magnésium* solubles dans le plasma d'un chien qui consolide une fracture osseuse varie considérablement, en présentant des hausses et des baisses étonnantes, dans les premiers dix-huit jours.

Lorsque la radiographie indique qu'il y a un début de précipitation des sels de calcium au niveau du cal osseux, ses variations s'atténuent. Elles deviennent de plus en plus insignifiantes à mesure que la calcification de la fracture s'intensifie.

Le phosphore, par contre, reste dans les limites normales; il ne dépasse qu'à peine la limite supérieure et, souvent même, baisse nettement au-dessous de la limite inférieure.

En multipliant les ions de Ca et de Mg, de Ca et de P, et enfin de Ca, de Mg et de P, on obtient des chiffres qui mettent encore mieux en évidence l'allure générale de ces variations.

Si l'on considère, en effet, le produit des trois ions, c'est-à-dire $Ca \times Mg \times P$ (graph. 4), on constate que, tandis qu'au début de la consolidation les chiffres obtenus présentent des écarts considérables en s'élevant (4,57-7,53) et s'abaissant (0,56-0,64) à tour de rôle, au-dessus et au-dessous de la normale (1), après le dix-huitième jour, ils ne présentent plus que de très petites variations, se maintenant même à des valeurs relativement basses.

La réserve alcaline est plus élevée pendant toute la durée de la consolidation; elle présente, en général, des maxima les jours où il y a eu une baisse brusque du calcium ou du magnésium.

Quelle est maintenant l'action du plasma sur la solution de *chlorure de calcium in vitro* ?

Aussi bien avant que pendant les trois premiers jours après la fracture des os, le plasma d'un chien ne trouble pas la solution de $Ca\,Cl_2$ *in vitro*. Vers le huitième jour, on voit apparaître un louche évident, dès qu'une goutte de plasma vient en contact avec la solution de $Ca\,Cl_2$. Au bout de dix à douze heures, il se forme un précipité indosable. Les jours suivants, cette réaction s'atténue ou s'intensifie pour ne disparaître complètement que trente-trois jours après que les os ont été fracturés, lorsque le processus de la consolidation semble complètement terminé.

Il semble, en général, que dans le phénomène de la calcification chez l'écrevisse, comme chez le chien, le sang transporte le calcium qu'il prend soit aux réserves calcaires, soit au reste de l'organisme, vers les endroits qui doivent se consolider. Là il s'accumule, grâce à la faculté que possèdent le cartilage et probablement la cuticule chitineuse d'absorber de grandes quantités de sels solubles de chaux. Lorsque l'accumulation est arrivée à un maximum, apparaît cette substance qu'on retrouve périodiquement dans le plasma sanguin qui favorise la précipitation des sels de calcium.

A une première précipitation suit une mobilisation et un nouveau transport de sels de chaux, puis une nouvelle apparition du pouvoir précipitant qui provoque à son tour une nouvelle précipitation des sels de chaux, et ainsi de suite jusqu'à saturation complète et définitive du cartilage ou de la chitine par les sels solubles de chaux.

Comment expliquer l'apparition de ce pouvoir précipitant dans le plasma des animaux en train de consolider une fracture ?

S'agit-il d'une modification de l'équilibre physico-chimique du plasma ? S'agit-il d'un ferment sécrété par les cellules de l'organisme ?

Au moment où nous faisons cette publication, nous ne possédons pas encore les preuves nécessaires pour affirmer qu'il s'agit d'une action de ferment.

Une première série d'essais nous a tout de même permis de voir que cette propriété précipitante du plasma se conserve intacte après un séjour d'une semaine à la glacière. Après un chauffage d'une demi-heure à 55°, le plasma trouble encore la solution de $Ca\,Cl_2$ *in vitro*, mais son pouvoir précipitant est très réduit, car en dosant le calcium resté en solution après l'action du plasma chauffé et non chauffé, nous avons constaté qu'après le chauffage le pouvoir précipitant du plasma était réduit de moitié.

NOTE ADDITIONNELLE

1° Variations provoquées par les saignées, les hémorragies, la maladie ou une inoculation quelconque dans la composition du liquide intérieur chez les crustacés décapodes.

2° Modification de la composition du liquide intérieur chez les *crabes parasités par la sacculine.*

Il nous est fréquemment arrivé, en étudiant le liquide intérieur des Astacus ou des Maïas, dans les premières heures qui suivent la mue, de voir que l'indice réfractométrique, ainsi que le taux des protéines coagulables par la chaleur, baissait beaucoup au-dessous des valeurs normales.

Chez l'Astacus, le taux des protéines revient généralement, deux à quatre heures après la chute de la carapace, à la normale (3 à 5 grammes pour 100 centimètres cubes). Pourtant, chez certains animaux, nous avons récolté, après la mue, un liquide intérieur qui ne contenait plus que 1,5 gr. de substances protéiques % centimètres cubes. Fait intéressant à noter, aussi longtemps que la carapace n'a pas commencé à durcir, malgré la pauvreté du liquide intérieur en substances protéiques, il coagule encore très fortement.

De même des Maïas, ayant une carapace incomplètement calcifiée, avaient parfois un liquide intérieur très pauvre en protéines coagulables par la chaleur (0,3 à 0,5 gr. %, au lieu des valeurs normales, 1,52-3,55 gr. %). Chez ces animaux, l'hémocyanine n'existait plus qu'à l'état de traces, la totalité des protéines présentant les caractères des pseudoglobulines.

Les animaux *abondamment saignés* présentent eux aussi une baisse appréciable du taux de leurs protéines coagulables par la chaleur.

Voici des expériences qui confirment ces affirmations :

Expérience 19. — Deux Astacus de taille moyenne sont saignés. On prélève, à chacun d'eux, 3 centimètres cubes de liquide intérieur. L'un des animaux (1) est gardé à sec, l'autre dans un bac rempli d'eau.

On constate que *la saignée provoque une disparition partielle des substances protéiques du plasma, qui se manifeste à peine ou pas du tout au bout d'une demi-heure, mais devient très nette au bout de vingt-quatre heures,* comme l'indique le tableau suivant :

	Astacus (1)	Astacus (2)
Avant la saignée :		
Divisions de l'échelle réfractométrique ...	43,1	37
Protéines coagulables à 100°	4,60 gr. %	3,28 gr. %
1/2 heure après la saignée :		
Divisions de l'échelle réfractométrique ...	43	36
24 heures après la saignée :		
Divisions de l'échelle réfractométrique ...	35	34
Protéines coagulables à 100°	2,84 gr. %	1,76 gr. %

Il y a donc, chez l'Astacus (1), 38 % des protéines du sang qui ont disparu vingt-quatre heures après la saignée, et, chez l'Astacus (2), 47 % des protéines du sang qui ont disparu vingt-quatre heures après la saignée.

Le taux des cendres restait sensiblement le même et l'Astacus, tenu à sec, présentait une baisse des protéines presqu'aussi grande que celui gardé dans l'eau. Cette diminution de la totalité des protéines ne peut pas être attribuée à la dilution du liquide intérieur par une absorption de l'eau environnante.

Expérience 2. — *Une langouste* de 2900 grammes a été saignée en lui prélevant 120 centimètres cubes de liquide intérieur. Remise dans son bac et ressaignée au bout de deux jours, elle fournit 100 centimètres cubes d'un liquide intérieur, dont l'aspect est parfaitement analogue à celui de la première saignée. De plus, il coagule fortement en formant un coagulum très peu rétractile. Pourtant, l'examen du tableau suivant montre nettement qu'il y a chez la langouste après la saignée, comme chez l'Astacus, une baisse sensible du taux des protéines coagulables par la chaleur.

	1re saignée, gr. % cc. sérum	2e saignée, gr. % cc. sérum
Protéines coagulables à 100°.	8,165	6,850
Hémocyanine	7,045	5,895
Globulines.....	1,120	0,955
Pseudoglobulines	1,12	0,955
Euglobulines (fibrinogène) ..	0	0
Rapport hémocyanine-globulines	6,3	6,1

15 % des protéines ont disparu du liquide intérieur de la langouste, quarante-huit heures après une forte saignée.

Les maladies spontanées, les asphyxies, ou *la simple inoculation d'un antigène quelconque,* provoquent chez l'Astacus des modifications considérables dans la composition du liquide intérieur.

Lorsqu'une écrevisse a séjourné trop longtemps dans une eau mal aérée, son sang change complètement d'aspect. Il devient *incoagulable,* ne bleuit plus au contact de l'air; le taux des protéines solubles baisse jusqu'à 0,5 gr. %, l'indice réfractométrique ayant au même moment une valeur égale à 28 divisions de l'échelle réfractométrique.

Trois Astacus (1) (2) (3), de grande taille, dont le liquide intérieur avait un indice compris entre 34,2 et 35,6 divisions de l'échelle réfractométrique, reçoivent, dans la cavité générale, par ponction d'une des pattes, 1 centimètre cube de suspension 1/20 de globules rouges de mouton lavés dans du sérum physiologique.

L'Astacus (1) est saigné cinq minutes, le (2) une demi-heure et le (3) vingt-quatre heures après cette inoculation.

On examine le sang de ces animaux entre lame et lamelle au microscope, on détermine l'indice réfractométrique, les protéines totales coagulables à 100°, l'hémocyanine et les globulines.

On constate, à l'examen microscopique, que *cinq minutes* après l'inoculation des globules rouges de mouton, les éléments figurés propres au sang de l'animal ont presque complètement disparu de la cavité générale, tandis que l'on y trouve encore une quantité assez grande des globules rouges injectés. *Après une demi-heure,* les éléments propres du sang d'Astacus n'ont pas encore reparu. On observe de rares hématies de mouton. *Après vingt-quatre heures,* les éléments figurés du sang ont réapparu en grand nombre; les globules rouges de mouton ont, par contre, complètement disparu.

Le liquide intérieur de ces animaux est incolore, il bleuit difficilement au contact de l'air, sa coagulation est fortement retardée (quatre jours).

Les protéines coagulables à 100°, ainsi que les différentes fractions, baissent de la manière suivante :

Après l'injection de globules rouges de mouton, gr. % cc. :

	Avant l'injection, division échelle réfracto-métrique	Division échelle réfracto-métrique	Protéines totales	Hémo-cyanine	Globulines	Cendres
Astacus :						
(1)	34,2	29,4	1,60	0,25	1,35	1,55
(2)	35,6	31	1,96	0,40	1,56	1,30
(3)	37	33,4	2,48	1	1,48	1,55

Il ressort de cette expérience qu'à la suite de l'inoculation de doses massives de globules rouges de mouton, le sang de l'Astacus devient, au bout de cinq à trente minutes, presqu'incoagulable, son contenu en protéines s'appauvrit nettement; les éléments figurés propres au sang de l'animal disparaissent presque totalement de la cavité générale.

Au bout de vingt-quatre heures, l'équilibre se rétablit en partie; les jours suivants, on voit apparaître un très grand nombre d'éléments figurés; le taux des albumines, de bas qu'il était, tend à redevenir normal.

Comment expliquer la facilité avec laquelle est modifiée la composition du liquide cavitaire chez les crustacés décapodes ? S'agirait-il de phénomènes dus à l'excitation d'un système végétatif rudimentaire existant chez ce groupe d'animaux ? Nous préférons rapporter nos observations, sans nous aventurer plus loin dans des considérations trop hardies.

Modifications de la composition du liquide intérieur chez les Carcinus mænas parasités par la sacculine.

Nous exposerons enfin, avant de passer aux conclusions de cette étude, les résultats de nos recherches comparatives sur le liquide intérieur des crabes normaux, sacculinés et ayant perdu leur sacculine.

	Crabes normaux		Crabes sacculinés		Crabes ayant perdu leur sacculine externe	
	éloignés de la mue	au voisinage immédiat de la mue	éloignés de la mue	au voisinage immédiat de la mue	éloignés de la mue	au voisinage immédiat de la mue
Protéines coagulables à 100°.	2,20	5,30	2,75	7,75	3,30	7,95
Hémocyanine ..	0,73	2,17	1	3,30	0,38	3
Globulines	0,67	2,80	1,49	4,27	2,92	4,62
Pseudoglobulines	0,31	2,13	0,95	3,31	2,32	3,90
Euglobulines ..	0,50	0,70	0,54	0,96	0,60	0,72
Viscosité	1,35	1,55	1,45	1,75	1,60	1,70

La totalité des substances protéiques coagulables à 100° augmente donc dans le liquide intérieur des crabes sacculinés. Cette augmentation est encore plus évidente chez les animaux qui ont perdu leur sacculine externe.

Il est fort probable que l'intoxication produite par la sacculine interne provoque, de la part de l'hôte, des réactions de défense qui sont plus marquées après la chute de la sacculine externe, lorsque les racines internes finissent par être résorbées. Cette défense se traduit par l'augmentation des substances protéiques et surtout de la fraction pseudo-globuline dont le taux s'élève de 0,31 à 2,13 gr. chez les crabes éloignés de la mue, et de 2,12 à 3,90 chez ceux qui sont au voisinage immédiat de la mue.

La viscosité augmente proportionnellement au taux des protéines. L'examen microscopique du sang des crabes normaux, comparativement à celui des crabes sacculinés, nous a permis de voir que, chez les animaux parasités, le nombre des éléments figurés à grandes granulations éosinophiles augmente considérablement en s'élevant de 13 % (crabe normal) à 48 % (crabes sacculinés).

Cette observation a été faite aussi bien chez les mâles que chez les femelles qui ne diffèrent guère entre eux. Les femelles porteuses d'œufs se comportent comme les femelles normales.

L'élévation du nombre des éléments à granulations éosinophiles semble donc être bien caractéristique pour le sang des animaux parasités. Bien que le rôle des granulations éosinophiles chez les crustacés décapodes soit très différent de celui des mêmes granulations chez les mammifères, nous attirons l'attention sur l'analogie qui existe entre le mode de réaction de l'hôte vis-à-vis d'un parasite infestant. Il semble être le même pour les vertébrés que pour les invertébrés.

CONCLUSIONS

L'étude des constantes physico-chimiques du sang des crustacés décapodes, dont nous venons d'exposer les résultats, nous permet de dégager, malgré les lacunes inévitables à un travail que la diversité des problèmes à résoudre rendait difficile, un certain nombre de faits positifs :

1° Les crustacés décapodes peuvent être groupés d'après la composition et les caractères physico-chimiques de leur liquide cavitaire, tout comme d'après leur aspect morphologique, en deux groupes :

a) Le groupe des Macroures ayant pour type : *l'Astacus fluviatilis* qui a fait l'objet principal de nos recherches.

b) Le groupe des Brachyoures ayant pour type : Maïa squinado.

2° Les animaux *des deux groupes* ont un sang relativement pauvre en éléments figurés; ceux-ci, excessivement fragiles chez toutes les espèces étudiées, s'altèrent très vite après la sortie du corps; ils s'agglutinent et forment une masse spongieuse qui surnage dans le liquide parfaitement limpide représentant le plasma. Cette altération, de même que l'agglutination qui s'en suit, ne peut être empêchée que par des anesthésiques, tels que le chlorhydrate de cocaïne ou le chloroforme. Les anticoagulants sont absolument sans action sur ce phénomène, considéré par certains auteurs comme représentant la première phase de la coagulation du sang chez les invertébrés. La substance qui détermine l'accolement des amibocytes et leur groupement en amas agglutinés n'est pas d'origine plasmatique, elle est issue des éléments figurés eux-mêmes.

3° Le plasma limpide qu'on obtient après la séparation spontanée des éléments figurés *reste indéfiniment liquide chez les Brachyoures à l'état normal,* tandis qu'*il coagule en formant un caillot compact très peu rétractile, chez les Macroures.* Ces der-

niers diffèrent donc des premiers par le fait que leur sang présente également la deuxième phase de la coagulation décrite chez les invertébrés. C'est cette deuxième phase qui est comparable en tout à la coagulation du sang des vertébrés. En effet, son apparition est due à la *précipitation,* sous forme de gel, *du fibrinogène* dissous dans le plasma. Cette précipitation se fait en présence des *sels de calcium,* sous *l'action d'un ferment* qui apparaît à la suite de la destruction des éléments figurés. Elle peut être empêchée soit par des substances qui insolubilisent ou bloquent les ions de calcium, soit par des substances qui paralysent l'activité du ferment, comme par exemple les anticoagulants usuels. Le fibrin-ferment du sang des invertébrés n'agit pas sur le fibrinogène des vertébrés et inversement.

4° Les Macroures, aussi bien que les Brachyoures, contiennent, en solution dans le plasma, des quantités notables de protéines coagulables par la chaleur; nous avons réussi à séparer ces dernières en trois fractions :

a) Une première qui présente les caractères du fibrinogène. Elle est relativement hydrophobe, car une dialyse de quarante-huit heures, de même que l'action de l'alcool ou de l'acétone, la rendent rapidement insoluble.

La chaleur la coagule à 56°. Son point isoélectrique est compris entre *p*H *5,7 et 6,9.* Le plasma des Macroures contient toujours du fibrinogène; par contre, il est absent ou n'existe qu'à l'état de traces dans le plasma des Brachyoures.

Au moment de la mue, il augmente considérablement chez les Macroures et devient nettement dosable chez les Brachyoures. *Réaction du cuivre négative.*

b) Une deuxième, qui présente les caractères des pseudo-globulines; elle n'existe qu'à l'état de traces dans le plasma. Elle constitue, par contre, la totalité des globulines du sérum et semble apparaître à la suite de gélification du fibrinogène. La chaleur la coagule entre *69° et 75°.* Son point isoélectrique est à *p*H *4,4. Réaction du cuivre négative.*

c) Enfin, après l'élimination des deux fractions, il ne reste plus en solution que l'hémocyanine. Elle précipite à 75 % de saturation par le sulfate d'ammonium ou après une dialyse prolongée (huit à dix jours). Elle coagule entre *64* et *65°*, son point isoélectrique est à *p*H 3,6. *Réaction du cuivre nettement positive.*

5° Le taux de ces différentes fractions varie d'une espèce à une autre. Il varie aussi avec les différents états physiologiques d'une même espèce. Ainsi, au moment de la mue, il y a une aug-

mentation considérable du taux des protéines coagulables par la chaleur. Cette augmentation porte surtout sur le fibrinogène.

6° L'équilibre des constituants protéiques du plasma des crustacés décapodes est très facilement détruit. Une hémorragie, une saignée, une injection de corps étrangers, une maladie spontanée, un séjour prolongé dans l'eau mal aérée, sont des conditions suffisantes pour faire baisser considérablement le taux des substances protéiques coagulables par la chaleur.

Il est donc indispensable, avant d'entreprendre une expérience d'immunisation, de contrôler le sang des animaux devant être immunisés (indice réfractométrique, coagulabilité), afin de voir si la composition de leur plasma correspond aux chiffres moyens que nous avons donnés pour les animaux à l'état normal.

7° Le plasma des crustacés décapodes examinés ne contient ni albumoses, ni peptones, ni acides aminés, ni ammoniaque. Il contient des traces d'urée et d'acide urique.

8° Les lipoïdes existent dans le plasma des crustacés décapodes en quantités dosables (0,11, Maïa; 0,50 %-0,59 %, Astacus et Eupagurus). Ils sont représentés par de la cholestérine libre et éthérifiée (0,12-0,70 %), des lipoïdes phosphorés dosables seulement chez les espèces marines, parmi les animaux étudiés; enfin, la majeure partie est formée par le lipochrome qui colore en rouge orangé le sang des animaux de ce groupe.

9° Le sang d'Astacus fluviatilis contient 0,16 à 0,20 gr. de glucose ‰. Un ferment glycolytique semble le détruire, car il disparaît au bout de deux à trois heures après la récolte du sang.

10° Le Δ du sang des crustacés décapodes est égal à 0,60 chez l'écrevisse en temps normal; chez les animaux marins, il varie entre 2,025 et 2,1, alors que le Δ de l'eau de mer à Roscoff est égal à 2,01.

11° Les ferments protéolytiques n'ont pas pu être mis en évidence dans le plasma de l'Astacus. Les éléments figurés décomposent l'eau oxygénée, mais le plasma limpide reste inactif. Pas de lipase. Présence d'une amylase dont le pouvoir augmente considérablement (de 6 à 67) chez l'écrevisse qui vient de muer.

12° Pendant toute la période de mue qui s'étend, chez l'Astacus, de mai en septembre (première mue, mai-juin; deuxième mue, août-septembre), des essais d'immunisation pourraient conduire à des résultats erronés, car le métabolisme de la majorité des substances qui entrent dans la composition du plasma (protéines coagulables par la chaleur, lipides, sels de calcium) subit à ce moment des modifications considérables.

13° Le plasma des crabes sacculinés est plus riche en protéines coagulables par la chaleur que le plasma des crabes normaux. Cette augmentation porte surtout sur la fraction pseudo-globulines qui s'élève de 0,31 à 2,32 % chez les animaux éloignés de la mue; de 2,13 à 3,90 chez ceux qui sont en période de mue.

14° Le plasma des écrevisses qui consolident leur nouvelle carapace acquiert périodiquement la propriété de troubler une solution de chlorure de calcium *in vitro*. Un phénomène analogue, bien que beaucoup plus atténué, s'observe chez les mammifères en train de consolider une fracture quelconque. Ce phénomène est très vraisemblablement lié à l'apparition momentanée d'un ferment thermolabile qui précipite les sels de calcium (affaiblissement de ce pouvoir par le chauffage à 55°).

L'étude cytologique du tégument chez les écrevisses en train de muer permet de saisir la voie suivie par les sels de Ca qui cheminent, à partir du sang, pour trouver les cellules épidermiques, et parviennent par un mécanisme décrit au cours de ce travail jusque dans la cuticule chitineuse, où leur précipitation s'opère au contact du ferment précipitant.

BIBLIOGRAPHIE

ARTHUS : « Recherches sur la coagulation du sang. » (*Thèse*, Paris, 1890.)

BAGLIONI : « Einige Daten zur Kenntnis der quantitativen Zusammensetzung verschiedener Körperflussigkeiten von Seetieren (Fischen und einigen Wirbellosen). » (*Hofmeisters Beiträge*, 1906, IX, 50; cité d'après Winterstein.)

BÉNÉDICT : *Journ. of Biology*, 1922, LI, 187 ; LIV, 233 ; 1925, LXIV, 215.

BLANCHETIÈRE (A.) : « Sur une méthode du dosage du sodium. » (*Bull. de la Soc. chimique de France*, 1923, XXXIII, 807.)

BOTAZZI (F.) : « La pression osmotique du sang des animaux marins. » (*Arch. ital. de Biol.*, 1897, XXVIII, 61-66.)

BROWINSKY : « Soufre neutre et oxydé dans le sang. » (*Bull. de la Soc. de Chimie biologique*, 1924, VI, 352.)

CANALS (M.-E.) : « Du dosage du calcium et du magnésium dans différents milieux salins. » (*Bull. de la Soc. chimique de France*, 1918, XXIII, 422.)

CANTACUZÈNE (J.) : « Formation d'hémolysines dans le sérum des *Maïas squinado* inoculés avec des hématies de mammifères. » (*C. R. Soc. Biol.*, 1920, LXXIII, 151-152.)

ID. : « Existence dans le sérum d'une substance antagoniste qui empêche ou retarde l'hémolyse. » (*Ibid.*, 1921, LXXXV, 970.)

ID. : « Cytolysines et cyto-agglutinines provoquées par l'inoculation du liquide cavitaire de Siponculus nudus chez *Maïa squinado*. » (*Ibid.*, 1923, LXXXIX, 266.)

ID. : « Observations relatives à certaines propriétés du sang de Carcinus mænas parasité par la sacculine. » (*Ibid.*, 1912, LXXIV, 109.)

ID. : « Sur la production d'anticorps chez Eupagurus prideauxi. » (*Ibid.*, 1913, LXXIV, 293.)

CHAHOWITCH : « Contribution à l'étude de l'immunité chez les crustacés décapodes. Effets de l'action des cellules microbiennes *in vivo*. Existence d'une immunité naturelle antitoxique chez les crustacés décapodes. » (*Annales Soc. Lyon*, 1924, LXX, 96; cité d'après J. Cantacuzène: « Immunité chez les invertébrés. »)

CLARK : *The determination of Hydrogen ions*, 1925, seconde édition, Williams et Wilkins.

CRACIUM (E.): « Die Heparin plasma Methode für Gewebekulturen. » (*Archiv. für exp. Zellforschung*, 1926, II.)

DAMBOVICEANU (A.) : « Quelques recherches sur les propriétés agglutinantes et précipitantes du sang d'Anodonta cyanea. » (*C. R. Soc. Biol.*, 1924, XCI, 276.)

ID. : « Sur les caractères physico-chimiques du sang de l'Anodonte. » (*Ibid.*, 1924, XCI, 739.)

ID. : « Recherches sur quelques constituants physico-chimiques du sang d'Hélix pomatia. » (*Ibid.*, 1923, LXXXIX, 2, 261.)

ID. : « Détermination de certains constituants du plasma de Sipunculus Nudus au cours de l'immunisation. » (*Ibid.*, 1926, XCV, 2, 115.)

Id. : « Variations des substances protéiques coagulables par la chaleur dans le plasma des Carcinus mænas normaux et sacculinés. » (*Ibid.*, 1928, XCVIII, 1, 1633.)

Id. : « Modifications physico-chimiques du plasma d'Astacus fluviatilis au moment de la mue. » (*Ibid.*, 1929, C, 900.)

Delaunay (H.) : « Sur l'azote restant du sang et du liquide cavitaire de quelques invertébrés. » (*Ibid.*, 1912, LXXIII, 492.)

Id. : « Sur l'azote restant du sang et du liquide cavitaire de quelques invertébrés. » (*Ibid.*, 1913, LXXIV, 151.)

Dohrn (A.) « Analectam ad historiam naturalem Astaci fluviatilis. » (Cité d'après Winterstein : *Handbuch der vergleichender Physiologie*, I, I. te Hfte.)

Duval (M.) : « Recherches physico-chimiques et physiologiques sur le milieu intérieur des animaux aquatiques. » (*Am. Inst. Océanographie*, 1925, II, 233.)

Fauré-Fremiet et Nichita (G.) : « Charge électrique et agglutination chez les amibocytes d'invertébrés marins. » (*Ann. de Physiol. et de Physico-Chimie biol.*, 1927, 247.)

Fontes-Thivolle : *Bull. Soc. de Chimie biol.*, 1921, III, 226.

Fosse : *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1916, XXX, 523.

Fredericq (Léon) : « Note sur le sang du Homard. » (*Bull. de l'Acad. royale de Belgique*, 1879, XLVII, 409.)

Freudenberg (E.) et Gyorgy (P.) : « Der verkalkungsvorgang bei der Entwicklung des Knochens. » (*Biochemische Zeitschr.*, 1924, CXLVII, 195.)

Gassmann (Th.) : « Chemische Untersüchungen von gesunden und rachitischen Knochen. » (*Hoppe-Seylers Z.*, 1910, LXX, 161 ; 1913, LXXXIII, 403.)

Gautrelet : « Sur les formes élémentaires du P chez les invertébrés. » *C. R.*, 1902, CXXXIV, 186.)

Griesbach (H.) : « Beitrag zur Kenntnis des Blutes. » (*Pflüg. Arch.*, 1891, L, 473.)

Griffits : « On the blood of invertebrates. » (*Proc. Royal Soc. Edimburg*, 1890-1891, XVIII, 298; cité d'après Winterstein.)

Guyot : *Paris médical*, 1931 ; relaté par Perrault.

Hagedorn-Jensen : *Biochemische Zeitschrift*, 1923, CXXXV, 46, et CXXXVII, 92.

Halliburton (W.) : « On the blood of decapod crustacea. » (*Journ. de Physiol.*, 1885, VI ; cité d'après Winterstein : *Handbuch der vergleichenden Physiologie*, Bd. I, I. te Hfte.)

Heim : « Etude sur le sang des crustacés décapodes. » (*Thèse* ; citée d'après Winterstein.)

Hofmeister : « Ueber Ablagerungen und Resorbtion von Kalksaltzen in den Geweben. » (*Erg. Phys.*, 1910, X, 429.)

Howard-Brown (J.) : « The colorimetric determination of the H ions concentration of small amount of fluid. » (*Journ. Laborat. and clinic. Medic.*, 1924, IX.)

Imbert : *Presse médicale*, 1931, vol. I, 403.

Javillier et Djelatides : « Sur une méthode de microdosage volumétrique du phosphore et son application à l'analyse biologique. » (*Bull. de la Soc. de Chimie biol.*, 1928, X, 342.)

Klement (R.) : « Die Zusammensetzung der Knochenstützsubstantz. » (*Hoope-Seylers Z.*, 1929, CLXXXIV, 132.)

Klinke (K.) : « Neuere Ergebnisse der Calciumforschung. » (*Erg. der Physiol.*, 1928, XXVI, 235.)

Kramer-Tisdall : « A chemical method for the quantitative determination of potassium in small amounts of serum. » (*Journ. of Biol. Chem.*, 1921, XLVI, 339.)

Krugenberg (Ch.) : « Zur vergleichenden Physiologie der Lymphe, der Hydro und Haemolymphe. » (*Vergleichende physiol. Studien* ; cité d'après Winterstein.)

Id. : « Zur Kenntnis des Hämocyanine und seiner Verbreitung im Tierreiche. » (*Centralblatt f. die Med. Wissenschaft,* 1880, 418; cité d'après Winterstein.)
Laudat : *Thèse,* 1920.
Lévy (R.) : « Sur la toxicité des tissus de la sacculine vis-à-vis du crabe (Carcinus mænas) et sur la recherche des réactions d'immunité chez ce dernier. » (*Bull. Soc. Zool. Paris,* 1923, XLIII, 291.)
Id. : « Sur la constatation des différences d'ordre physico-chimique entre le sérum des crabes sacculinés et celui des crabes normaux. » *Bull. Soc. Zool. Paris,* 1924, XLIX, 333.)
Lichtwitz : « Ueber die Bedeutung der Kolloide für die Konkrementbildung und die Verkalkung. » (*Deutsche Med. Wochenschr.,* 1910.)
Loeb (Leo) : « Ueber die Blutgerinnung bei Wirbellosen. » (*Biochem. Zeit.,* 1910, XXIV, 478.)
Maquenne (M.-L.) : « Sur le dosage de très petites quantités de fer. » (*Bull. de la Soc. chim. de France,* XXIX, 1921, 585.)
Meyer (Horste) : *Jahrb. f. Kinderk.,* 1931, CXXXI, 203.
Michaelis (L.) : *Praktikum der physikalischen Chemie,* 1921, Julius Springer, Berlin.
Nolf (P.) : « Contribution à l'étude du sang des crustacés. » (*Arch. intern. de Physiol.,* 1909, VII, 411.)
Id. : « Contribution à l'étude du sang des crustacés. » (*Ibid.,* 280.)
Id. : « Contribution à l'étude du sang des crustacés. » (*Ibid.,* 379.)
Pauli (W.) et Samec (M.) : « Löslikhkeitsbeeinflussung von Elektrolyten durch Eiweisskörper. » (*Biochem. Zeit.,* 1903, XVII, 235.)
Pfaundler : *Jahrb. für Kinderheilkunde,* 1903, LX, 123.
Pietre et Villa : *C. R. Acad. des Sciences,* 1920, CLXX, 1372 et 1466.
Id. : *Ibid.,* CLXXII, 1051.
Robison (R.) et Soames (K.-M.) : « The possible significance of hexose phosphoric sters in ossification. » (*Biochem. Journ,,* 1924, XVIII, 740, 755.)
Schwartz (R.), Eden (R.) et Hermann (R.) : « Chemischer Ablauf und Beeinflussung von Frakturheilungen. » (*Biochem. Zeitschr.,* 1924, CXLIX, 100.)
Schönheimer (R.) et Oshima (F.) : « Der Kupfergehalt normalen und pathologischer Organe. » (*Zeitschrift für physiologische Chemie,* 1929, CLXXX, 249.)
Tait (John) : « Type of crustacea blood coagulation. » (*Journ. of the Marine Biol. Assoc.,* 1911, IX, 19; cité d'après Winterstein.)
Tait (J.) et Gunn (J.) : « The blood of Astacus fluviatilis, a study in crustacea blood, with special referrence to coagulation and phagocytosis. » (*Q. J. Exp. Physiol.,* 1918, XII, 35.)
Todd (Charles) : « On the electrical behaviour of bacteriophage. » (*Brit. Journ. of Exp. Pathol.,* 1927, VIII, 369.)
Verne (J.) : « Les pigments tégumentaires chez les crustacés décapodes. » (*Archives de Morphologie générale,* 1923.)
Id. : *Les pigments dans l'organisme animal.* Encyclopédie scientifique, G. Doin, Paris.
Waard (J. de) : « Eine Mikrobestimmung des Calciums in Blutserum und andere organischen Substanzen. » (*Biochem. Zeit.,* 1919, XCVII, 176.)
Wells (H.-G.) : « Pathological calcification. » (*Journ. med. Research.,* 1905-1906, XIV, 491.)
Wigglesworth (Clarke) et Walter Calhonn (Wheller) : *The inorganic constituens of marin invertebrates,* Washington, 1922.
Witting : « Ueber das Blut einiger Crustaceen und Molusken. » (*Jahrb. für prakt. Chemie,* 1858, LXXIII, 123; cité d'après Winterstein.)

SUR UNE ÉPIDÉMIE DE FIÈVRE EXANTHÉMATIQUE : FIÈVRE BOUTONNEUSE OU FIÈVRE ESCHARO-NODULAIRE

(observée à Constantza [Roumanie])

(Premier Mémoire)

par

D. COMBIESCO

(Travail du Laboratoire de Médecine expérimentale et Institut de Sérologie « Professeur Docteur I. Cantacuzène », de Bucarest)

Dans une note préliminaire présentée au Comité de l'Office international d'Hygiène publique, dans sa session d'octobre 1931, par M. le professeur docteur I. Cantacuzène, délégué de la Roumanie, nous avons exposé, dans quelques indications sommaires, les caractères cliniques et épidémiologiques d'une maladie qui, jusqu'ici, n'avait pas encore été connue en Roumanie, où tout au moins on ne l'avait pas encore rencontrée sous une forme épidémique comme à l'occasion de la petite épidémie survenue à Constantza pendant l'été de 1931.

A cette occasion, nous avons donné aussi les premiers résultats des recherches expérimentales entreprises jusqu'à ce moment.

L'étude clinique, aussi bien que l'étude expérimentale, nous ont montré qu'il s'agissait là de la maladie décrite, par D. Olmer, sous le nom de fièvre exanthématique de Marseille.

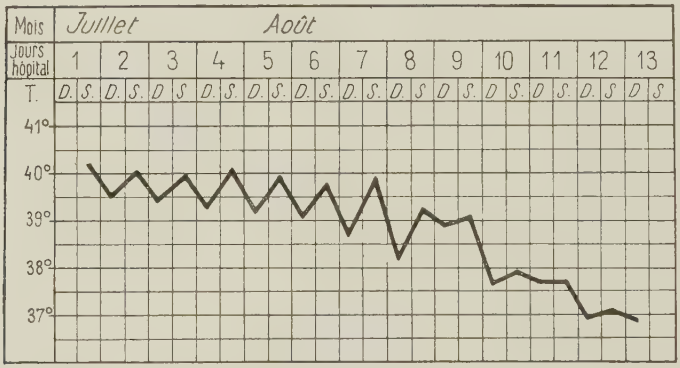
Dans ce mémoire, nous voulons donner une description plus détaillée de la symptomatologie et l'épidémiologie de cette maladie, et compléter nos recherches expérimentales.

SIGNES CLINIQUES

(avec la collaboration de G. Barzanesco et V. Vasiliu, *médecins de l'hôpital « Docteur V. Sion », de Constantza).*

La relation de quelques observations des malades soignés dans le service « Izolarea », de l'hôpital « Docteur V. Sion », de Constantza, nous donnera une idée assez complète sur les caractères cliniques de cette maladie.

Observation I. — La malade E. C..., cinquante-huit ans, vient à l'hôpital, le 28 juillet 1931, pour fièvre, céphalalgie, arthralgies. Quatre jours auparavant, elle a eu un frisson, suivi de fièvre avec température



Courbe thermométrique n° 1, du malade E. C...

de 40°, céphalalgie et courbature. Cet état s'est maintenu les jours suivants, et le troisième jour la malade observe une éruption sur les membres et le corps, ce qui la décide de venir à l'hôpital.

A la présentation à l'hôpital, la malade accuse une certaine lassitude, céphalée et des douleurs articulaires. Elle a 39°4 de température; le pouls, bien battu, compte 90 pulsations. La langue est saburrale, légèrement sèche. Rien d'anormal du côté de l'appareil respiratoire.

L'éruption présentée par la malade a les caractères suivants : elle est formée d'éléments maculo-papuleux ayant les dimensions d'une tête d'épingle ou d'une lentille (de 2 à 5 millimètres de diamètre), étant de teinte rouge. Les éléments éruptifs, arrondis ou ovalaires, sont isolés et séparés par de la peau saine. L'éruption est généralisée, présentant une certaine prédominance sur les cuisses, sur les jambes, sur les bras et les avant-bras, et aussi sur la paume des mains et sur la plante des pieds. Ces taches éruptives s'effacent presque complètement par la pression du doigt.

Les examens bactériologiques faits ont donné des résultats négatifs : hémoculture, séro-réaction de Widal pour les bacilles typhiques et paratyphiques A et B, séro-réaction de Weil-Félix.

Le 3 août, la température arrive à 37°, la chute se faisant en lysis. L'éruption est devenue d'une teinte violacée.

Le 13 août, on répète l'examen du sang : l'hémoculture reste négative, la réaction de Weil-Félix de même.

Le 23 août, la malade guérie quitte l'hôpital; l'éruption, quoique très pâle, persiste encore.

Nous n'avons pas pu trouver chez cette malade aucune lésion qui aurait pu être considérée comme la « tache noire » décrite par I. Piéri et Brugéas, dans la fièvre exanthématique de Marseille (courbe n° 1).

Observation II. — Le malade P. P..., quarante-quatre ans, vient à l'hôpital, le 4 août, pour un état fébrile, céphalalgie, arthralgies et une éruption généralisée sur tout le corps.

Le 26 juillet 1931, le malade a eu un frisson avec 40°5 de température, courbature, céphalée, arthralgies. Cet état persiste les jours suivants et, le 30 juillet, il observe une éruption sur le corps et les membres.

Le 4 août, jour de présentation à l'hôpital, le malade à 40° de température, 98 pulsations bien frappées. Il accuse de la céphalalgie, arthralgies et une certaine lassitude. La langue est sèche et un peu brûlée. Sur le corps et sur les membres, on observe une éruption maculo-papuleuse, de couleur rougeâtre, les éléments éruptifs ayant les dimensions d'une lentille. On remarque aussi quelques taches discrètes sur la face. La plante des pieds et la paume des mains sont invadées.

Le 5 août, l'état général est légèrement amélioré; l'éruption est plus accentuée, dans le sens que les éléments éruptifs se sont multipliés. A l'examen du sang, nous trouvons la séro-réaction de Widal pour les bacilles typhiques et paratyphiques A et B, et la séro-réaction de Weil-Félix négatives.

Le 7 août, le malade accuse des douleurs dans l'hémithorax droit. La température atteint 40° et, à l'auscultation, on perçoit des râles muqueux à la base du poumon droit, avec une légère matité à la percussion.

Le 10 août, même état, le malade tousse un peu plus.

Les séro-réactions de Widal et de Weil-Félix sont toujours négatives.

Le 14 août, la défervescence se produit, la température arrive à 37°2, la chute se fait en lysis.

De nouveau, la séro-réaction de Widal est négative.

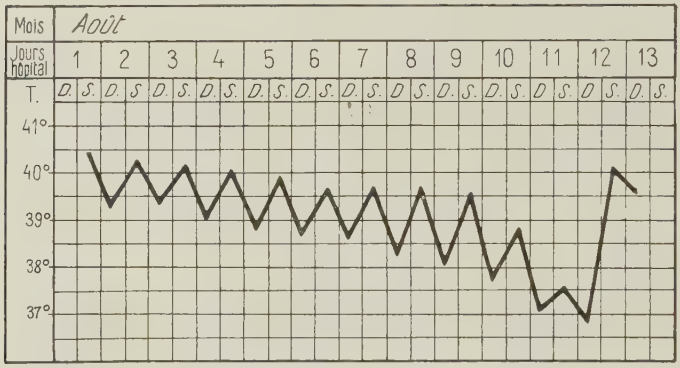
L'hémoculture, de même, reste négative. L'éruption prend une teinte violacée et certains éléments sont devenus purpuriques.

Le 20 août, *la séro-réaction de Weil-Félix est positive à une dilution du sérum de 1 ‰.*

Le 23 août, le malade guéri, quitte l'hôpital, mais l'éruption, d'une teinte très pâle, avec quelques éléments purpuriques, persiste encore.

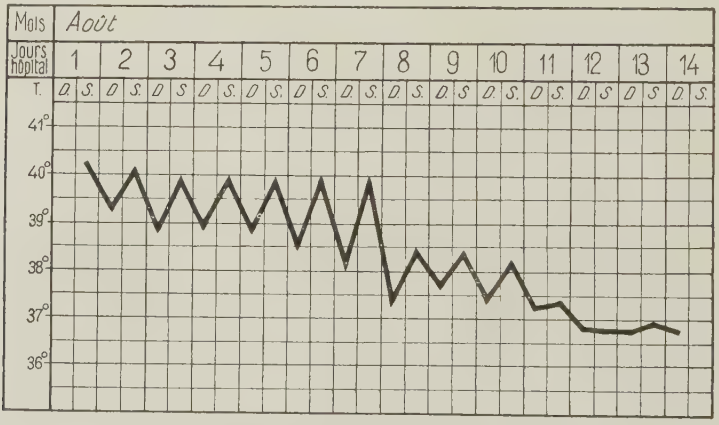
Chez ce malade, nous n'avons trouvé aucune lésion qui pourrait

être considérée comme « la tache noire » décrite par I. Piéri et Brugéas (courbe n° 2).



Courbe thermométrique n° 2, du malade P. P...

Observation III. — Le malade L. K..., vingt-six ans, vient à l'hôpital, le 8 août, pour céphalalgie, arthralgies, myalgies, fièvre, éruption généralisée sur tout le corps.



Courbe thermométrique n° 3, du malade L. K...

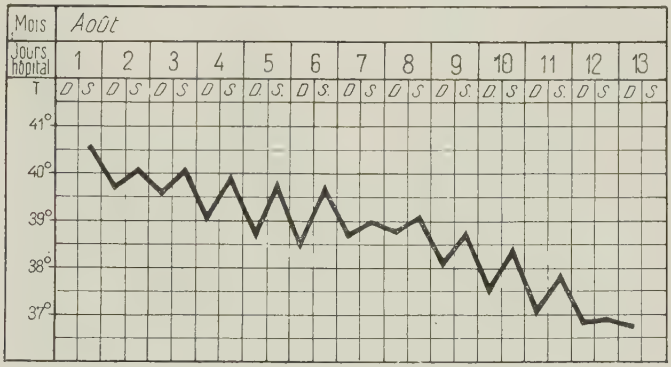
La maladie a eu un début brusque le 3 août, quand le malade a eu un frisson, la température arrivant à 40°2, de la courbature, etc. Les phénomènes généraux ont persisté les jours suivants avec des exacerbations et, le troisième jour, le malade observe une éruption sur les membres et l'abdomen.

Le 8 août, le jour de présentation à l'hôpital, la température est de 39°9, le pouls à 96 pulsations. L'état général est relativement bon; la langue saburrale. *Le malade présente une ecchymose de l'angle externe de l'œil gauche. Avant de tomber malade, il a présenté un œdème des paupières de l'œil gauche.* Sur les cuisses et sur l'abdomen, on constate une éruption papuleuse, rougeâtre. L'éruption intéresse aussi la paume des mains et la plante des pieds.

Le 10 août, la séro-réaction de Widal a été positive pour les bacilles typhiques et paratyphiques A et B, le malade ayant été vacciné récemment avec du T. A. B. La séro-réaction de Weil-Félix a été négative.

Le 14 août, température normale; l'état général est bon. L'éruption commence à modifier de teinte. *La séro-réaction Weil-Félix,* cette fois-ci, est positive jusqu'à une dilution de 1/200 du sérum du malade.

L'hémoculture a été toujours négative.



Courbe thermométrique n° 4, de la malade E. Tr...

Le 23 août, le malade guéri quitte l'hôpital, mais l'éruption, d'une couleur violacée pâle, persiste encore.

Pour des motifs que nous décrirons plus tard, nous considérons la lésion oculaire présentée par ce malade comme la porte d'entrée de l'infection, et nous l'identifions à « la tache noire » décrite par I. Piéri et Brugéas, dans la fièvre exanthématique de Marseille (courbe n° 3).

Observation IV. — La malade E. Tr..., trente-quatre ans, vient à l'hôpital, le 8 août, présentant de la fièvre, céphalalgie, arthralgies et *une escarre sur la partie interne de la jambe droite.*

Le 3 août, étant assise à table, dans la cour, la malade a été piquée (elle suppose par une mouche ?) sur la face interne de la jambe droite, et immédiatement, à cette place, s'est produit une zone érythémateuse ayant les dimensions d'une pièce de cinq francs. La malade prétend que, quelques heures plus tard (dans la soirée du même jour), elle a eu un frisson avec 40°5 de température, de la courbature, céphalée et arthralgies. Le lendemain, au niveau de la piqûre, elle a observé un

point noir. Les jours suivants aux symptômes cités se sont ajoutés des vomissements, et au niveau de la piqûre s'est formée une petite escarre. *La malade consulte un chirurgien qui, supposant une pustule maligne, l'envoie à l'hôpital des maladies contagieuses.* A l'hôpital, l'aspect de la lésion, qui se trouve sur la face interne de la jambe droite, décide le médecin d'instituer le traitement anticharbonneux avec du sérum spécifique, sans attendre le résultat de l'examen bactériologique (photo n° 1).

Photo n° 1. — Tache noire.

Le lendemain de l'inoculation du sérum (le 9 août), on observe une éruption discrète sur les jambes et les cuisses.

Le 10 août, la malade a 39° de température, le pouls est de 82 pulsations bien frappées, l'éruption est plus abondante; les éléments éruptifs ont un aspect papuleux et des dimensions variables, en général celle d'une lentille. L'éruption intéresse aussi la face, la paume des mains et la plante des pieds. La malade accuse encore de la céphalée et des arthralgies.

Les séro-réactions de Widal et Weil-Félix sont négatives.

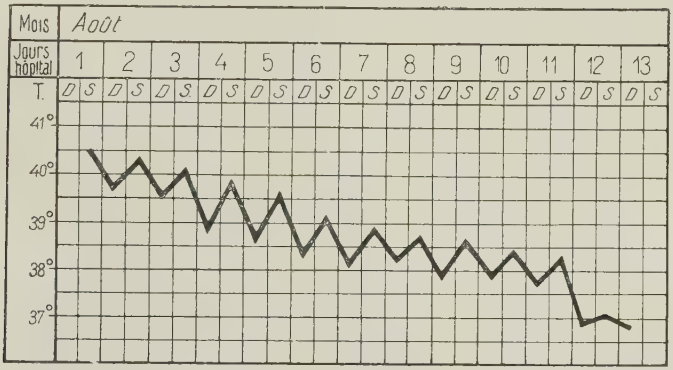
Le 15 août, température normale, chute en lysis, les phénomènes généraux ont disparu.

Le 23 août, la malade guérie quitte l'hôpital, mais l'éruption, quoique très pâle, persiste encore (courbe n° 4).

Observation V. — La malade A. P. P..., trente-quatre ans, vient à l'hôpital, le 14 août, présentant de la fièvre, courbature, céphalée et scapulalgie.

Le 2 août, *elle a eu la sensation d'un corps étranger dans l'œil gauche. Les paupières se sont tuméfiées, un chémosis s'est installé, ce qui l'obligea de consulter un médecin-oculiste.*

Le 3 août, la température de la malade arrive à 40°5; la céphalée, la courbature, les arthralgies apparaissent.



Courbe thermométrique n° 5, de la malade A. P. P...

Le 6 août, la malade observe une éruption sur l'abdomen et sur les extrémités. Les jours suivants, la température se maintient.

Le 14 août, la malade est isolée à l'hôpital, avec 37°8-38°4 de température; pouls, 80 ; langue saburrale et état général relativement bon. Elle accuse de la céphalalgie et des douleurs scapulaires. En même temps, on constate une éruption maculo-papuleuse, rougeâtre, les éléments éruptifs ayant la dimension d'une lentille et ne présentant aucune tendance à la confluence. L'éruption présente un maximum de prédominance sur les cuisses; elle ne respecte pas la face, la paume des mains et la plante des pieds. A l'examen de l'œil gauche, on voit une ecchymose conjonctivale assez étendue.

Le 15 août, même état; les séro-réactions de Widal et Weil-Félix sont négatives. L'hémoculture est négative.

Le 16 août, 37°; les symptômes morbides ont disparu.

Le 23 août, la malade guérie quitte l'hôpital; l'éruption devenue violacée persiste encore.

Comme dans le cas du malade de l'observation III, la lésion oculaire présentée par cette malade est considérée comme la porte

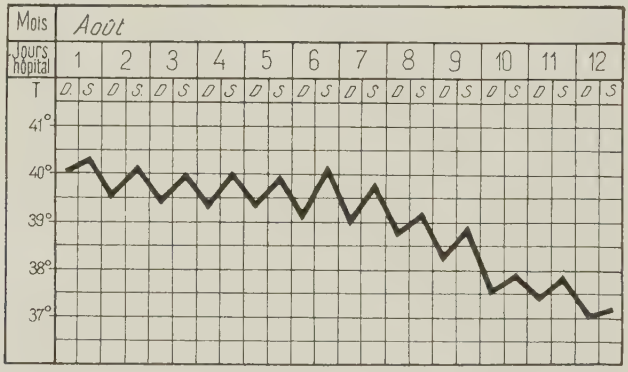
d'entrée ou chancre d'inoculation de l'infection et est identifiée à « la tache noire » de I. Piéri et Brugéas (courbe n° 5).

Observation VI. — La malade G..., de quarante-neuf ans, est isolée à l'hôpital, le 17 août, à cause d'une éruption généralisée qu'elle présentait. Elle accusait en même temps de la céphalée, des arthralgies et de la fièvre.

Le 10 août, le matin, elle a eu un frisson, de la fièvre.

Le 11 août, la malade a observé une tache rougeâtre, ayant la dimension d'une pièce de 2 francs et étant située dans la région interne de l'œil gauche.

Le 12 août, les phénomènes généraux persistaient et la tache de la région interne de l'œil gauche était remplacée par une escarre noire. En même temps, la malade observe une éruption sur le corps et sur les membres.



Courbe thermométrique n° 6, de la malade G...

Le 17 août, la malade est isolée à l'hôpital. L'éruption maculo-papuleuse, assez caractéristique, est généralisée et intéresse aussi la face, la paume des mains et la plante des pieds. L'escarre persiste.

L'hémoculture, les séro-réactions de Widal et Weil-Félix sont négatives.

Le 22 août, état général bon.

Le 28 août, la malade guérie quitte l'hôpital (courbe n° 6).

Observation VII. — La malade P. Cr..., cinquante-trois ans, vient à l'hôpital pour céphalée, arthralgies, myalgies, fièvre, points de côté dans l'hémithorax droit et une éruption généralisée.

Le 13 août, elle a eu un frisson et points de côté dans l'hémithorax droit, suivis de température. Les jours suivants, les phénomènes généraux se sont aggravés, la température est arrivée à 40°5.

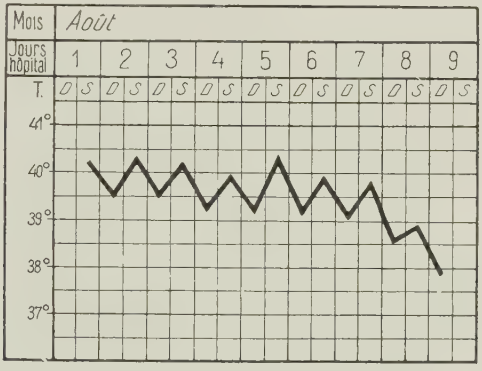
Le 16 août, la malade a observé une éruption généralisée sur tout le corps.

Le 22 août, elle a été transportée à l'hôpital, quand la température était à 39°, le pouls faible comptait 96 pulsations. La malade accusait

de la céphalée, des myalgies. A l'examen, on trouve une matité à la base du poumon droit. L'expectoration est muco-purulente. Sur le corps, on voit une éruption assez abondante, de teinte rouge, avec des éléments maculo-papuleux de la dimension d'une lentille et qui disparaissent presque complètement sous la pression du doigt. On découvre des éléments éruptifs sur la face, la paume des mains et la plante des pieds (photo n° 2).

La maladie évolue normalement, sans accidents et, le 27 août, la température tombe à 37°4, l'état général s'est amélioré; une semaine plus tard, la malade guérie quitte l'hôpital, gardant encore des taches violacées pâles.

Nous n'avons trouvé, chez cette malade, aucune lésion qui aurait pu être considérée comme « une tache noire » (courbe n° 7) (photo n° 2).



Courbe thermométrique n° 7, de la malade P. Cr...

Observation VIII. — La malade V. P..., vingt-huit ans, vient à l'hôpital pour fièvre, céphalalgie, arthralgies et éruption généralisée.

Le 20 août, la malade a observé une tache rouge dans la région paraombilicale gauche. Cette tache avait au milieu un point noir. Les jours suivants, la tache a pris l'aspect d'une escarre nécrotique. La malade se plaignait en même temps de céphalalgie.

Le 23 août, on remarque une éruption sur le thorax et les extrémités qui, dans quelques jours, s'est généralisée.

Le 28 août, jour de présentation à l'hôpital, l'éruption est maculo-papuleuse et intéresse aussi la face, la paume des mains et la plante des pieds. La tache noire est évidente (photo n° 3).

La chute de la température se fait en lysis et la malade se remet rapidement (courbe n° 8).

Observation IX. — L'enfant A. M..., huit mois, est apporté à l'hôpital pour fièvre et éruption généralisée.

Le 31 août 1931, le soir, l'enfant est agité et fébrile. Trois jours plus tard, sa mère a observé quelques taches sur le corps, *et en même*

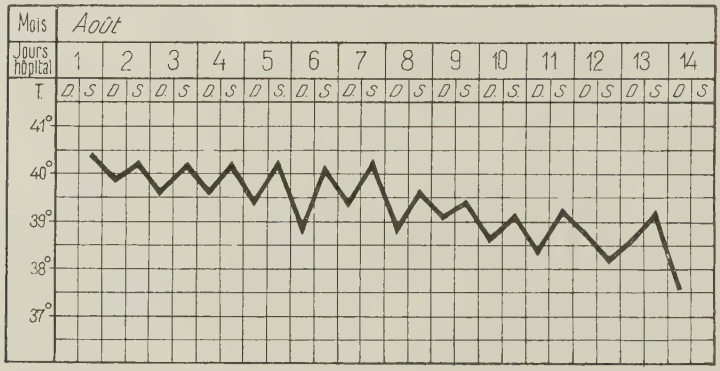
temps une tique était fixée dans la région ombilicale. On est arrivé à l'arracher avec grande difficulté.

Les jours suivants, la fièvre se maintient, les éléments éruptifs se multiplient et l'enfant est transporté à l'hôpital le 5 septembre.

A l'hôpital, on constate une éruption papuleuse, dont les éléments arrivent à avoir la dimension d'une lentille. L'éruption s'étend à tout le tégument; ni la face, ni la paume des mains et la plante des pieds ne sont respectées. Dans la région paraombilicale gauche, on observe une escarre noire, ayant les dimensions d'une graine de maïs.

La maladie évolue sans accidents, la chute de la température se fait en lysis.

Le 15 septembre, l'enfant guéri quitte l'hôpital, l'éruption presque complètement disparue.



Courbe thermométrique n° 8, de la malade V. P...

Ajoutant à ces neufs observations la symptomatologie clinique observée chez les autres 25 malades découverts dans la même localité et dans le même intervalle de temps, nous pourrions donner la description suivante au tableau clinique rencontré dans cette maladie.

Elle débute d'ordinaire brusquement, par un frisson suivi d'une élévation thermique qui dépasse souvent 40°. On note de la céphalée, de la courbature générale, des arthralgies et des myalgies diverses. Langue saburrale, constipation légère, rarement de la diarrhée.

Avant le début de l'éruption et dans un grand nombre de cas (17 fois sur 34 malades), — mais non d'une manière absolument constante, — on constate l'apparition de la tache noire de I. Piéri et Brugéas; cette dernière se présente sous l'aspect d'une escarre circulaire, entourée d'une zone brun rougeâtre, de

dimensions variables, mais ne dépassant pas le diamètre d'une pièce de 1 ou 2 francs; le siège de la lésion varie : on l'observe souvent aux membres inférieurs ou à la région périombilicale; dans un cas, elle siégeait sur la paupière supérieure; la « tache noire » est tantôt unique, tantôt multiple (deux à trois); elle

Photo n° 2.

persiste souvent jusqu'après la défervescence et s'accompagne toujours d'une forte augmentation de volume des ganglions correspondants (photo n° 4).

Trois ou quatre jours après le frisson initial, l'éruption apparaît sous forme de poussées, elle envahit rapidement tout le corps sans respecter la face; elle est constante dans la paume des mains et sur la plante des pieds (photo n° 5); ce sont, au

début, des macules disparaissant à la pression et dont la dimension varie de celle d'une tête d'épingle à celle d'une graine de lentille, à contours nets, séparées par des espaces de peau saine; ces taches ne tardent pas à prendre l'aspect papuleux, puis à faire une saillie assez prononcée, légèrement rénitente à la palpa-

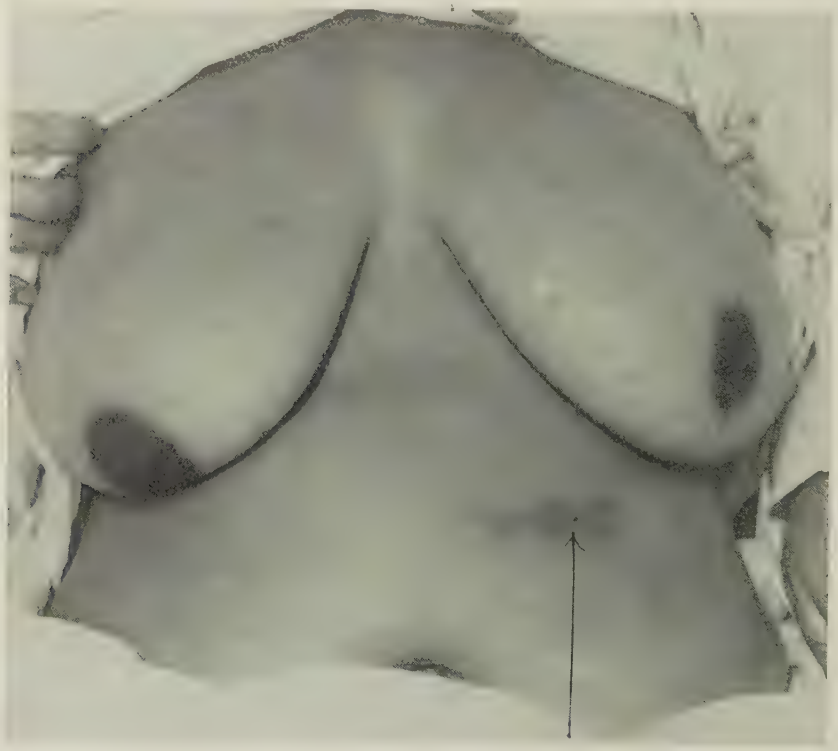


Photo n° 3. — Tache noire.

tion; assez souvent, elles deviennent hémorragiques, prenant le caractère pétéchial, et sous cette forme peuvent persister longtemps après la défervescence.

La durée de la période fébrile est de dix à douze jours, avec des rémissions matinales de 1° à 2°. On constate une certaine dissociation entre le pouls et la température; le premier, bien frappé, se maintient entre 90 et 100 pulsations, alors que la température oscille entre 39°5 et 40°.

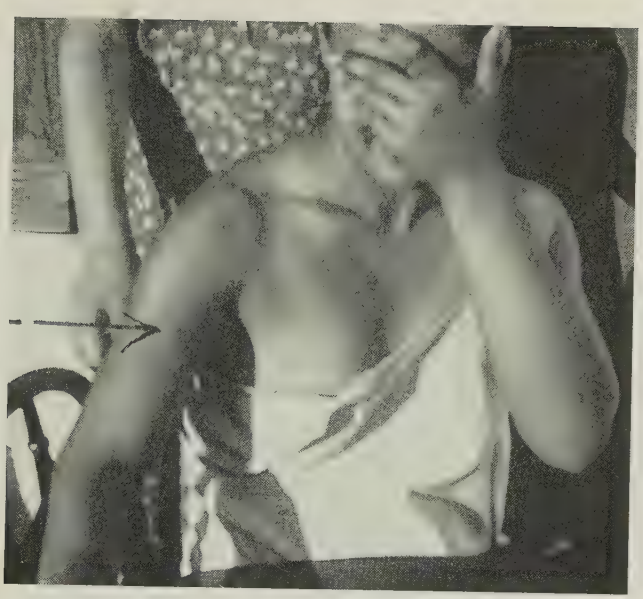


Photo n° 4. — Persistance de la « tache noire » dans la convalescence.

Photo n° 5. — Eruption sur la plante des pieds.

Photo n° 6.

Photo n° 7.

L'état général du malade reste généralement bon; la rate n'est pas augmentée de volume. On ne constate ni stupeur, ni délire; les réactions méningées sont inexistantes. La défervescence se fait en lysis, vers le onzième ou le douzième jour; l'éruption disparaît sans laisser de traces et sans donner lieu à une desquamation quelconque.

Le pronostic est bénin; nous n'avons observé qu'un seul cas mortel (sur 34) : il s'agissait d'une vieille femme de quatre-vingt-deux ans, présentant des lésions de myocardite chronique. Nous n'avons observé ni rechutes, ni récidives.

En général, on peut distinguer les formes cliniques suivantes :

a) Formes typhoïdiques avec léger état de stupeur, qui ne saurait d'ailleurs se comparer comme intensité avec ce qu'on observe dans le typhus exanthématique.

b) Formes à éruption très abondante, presque confluente; (photos n^{os} 6 et 7).

c) Formes à éruption très discrète.

Généralement, la maladie entière évolue en douze jours; l'on a noté, cependant, des cas où cette évolution fut écourtée et réduite à neuf jours.

Les complications sont rares. Nous avons observé 2 cas de congestion pulmonaire.

CARACTÈRES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

(*en collaboration avec* M. Isacesco *et* R. Olinesco).

A l'occasion de l'épidémie survenue à Constantza pendant l'été de 1931, l'enquête a permis de relever 11 cas observés par les médecins locaux au cours des vingt dernières années; d'après les descriptions qu'ils en donnent, ces cas doivent être mis sur le compte de la fièvre exanthématique; ils sont distribués comme suit (indications des docteurs Saraphide et Barzanesco) :

En	1910	2 cas
	1923	2 —
	1925	1 —
	1928	4 —
	1930	2 —

Le docteur Barzanesco, qui, en 1928, a eu à soigner 3 de ces cas suspects, avait hésité entre le diagnostic de typhus exanthématique et celui d'érythème polymorphe, la réaction de Weil-

Félix étant restée négative dans les 3 cas. Après avoir examiné les cas de la récente épidémie, ses doutes disparurent et il n'hésita pas à identifier ces derniers avec ceux de 1928. Ainsi donc, des cas de fièvre exanthématique méditerranéenne apparaissent à Constantza, depuis plusieurs années, sporadiquement. Il est infiniment probable que les quelques cas signalés plus haut ne furent pas les seuls; mais ils ne furent pas assez nombreux pour imposer l'attention, sans parler des formes frustes ou inapparentes, dont l'existence est toujours nécessairement liée à celle des cas sporadiques.

Ce n'est qu'au cours de l'été dernier que la maladie se présenta pour la première fois sous forme épidémique. Elle a sévi seulement dans la ville de Constantza. On n'a signalé aucun cas dans l'intérieur du district de Constantza, dans les villages plus ou moins éloignés de cette ville.

La fièvre exanthématique est une maladie saisonnière. Elle se manifesta vers la fin de juillet, jusqu'au 30 septembre 1931. On a signalé 34 cas se répartissant comme suit :

Du 24 au 28 juillet.....	2 cas
29 juillet au 2 août.....	5 —
3 août au 30 août.....	21 —
1er au 30 septembre.....	6 —

Si l'on étudie la distribution de ces cas dans la ville de Constantza, l'on ne constate aucun groupement de foyer. Dans deux maisons seulement, on constata l'apparition de deux cas par famille survenus simultanément dans l'une, à huit jours d'intervalle dans l'autre. Jamais l'on ne signala de cas de contagion parmi le personnel qui soignait les malades.

Relativement au sexe, on constate une prédominance nette des cas féminins relativement à ceux survenus chez les hommes; si, parmi ces derniers, l'on fait abstraction d'un cas observé chez un enfant de huit mois et d'un autre chez un enfant de quatre ans, l'on trouve 1 cas chez les hommes pour 3 cas chez les femmes.

L'âge ne semble pas avoir joué de rôle, le plus jeune des malades étant âgé de huit mois, le plus âgé de quatre-vingt-deux ans; l'on note 2 cas de quatre ans, 2 cas entre cinq et dix ans, 7 cas entre dix et vingt-cinq ans, 9 cas entre vingt-cinq et trente-cinq ans, 6 cas entre quarante et cinquante ans, 6 cas entre cinquante et soixante ans, 1 seul cas au-dessus de soixante ans. Ce dernier fut le seul mortel : il s'agissait d'une

femme de quatre-vingt-deux ans; le pronostic de tous les autres fut assez bénin.

Ces malades appartenaient aux professions les plus diverses : des militaires, des commerçants, des fonctionnaires, des boulangers, des menuisiers, des femmes vivant dans leur ménage, etc.

Dans aucun des cas observés, on ne constata la présence de poux sur la chemise, la peau ou les vêtements.

Au contraire, dans 27 cas sur 33, on trouva, sur les chiens habitant la même cour que les malades, des tiques très nombreuses; tous les chiens étaient porteurs de Rhipicephalus sanguineus en grand nombre, auxquels viennent s'ajouter quelques Ixodes ricinus peu nombreux.

Dans tout cet intervalle de temps, selon la déclaration du médecin du port, aucun cas ne fut signalé à bord des navires.

Recherches expérimentales

Pour la commodité de l'exposition, nous chercherons à sérier les expériences faites sans respecter tout à fait leur succession chronologique.

I. — Première série d'expériences.

La première série d'expériences se réfère aux essais faits, chez l'homme ou chez les animaux de laboratoire, avec le sang citraté, avec l'urine ou avec le liquide céphalo-rachidien prélevés chez les malades de Constantza. Les liquides à inoculer, récoltés à Constantza, ont été transportés à Bucarest et l'injection était faite d'habitude vingt à vingt-quatre heures après le prélèvement. Le produit supposé infectant était gardé tout ce temps à la température environnante de 26° à 32°.

Deux paralytiques généraux furent inoculés sous la peau chacun avec 10 centimètres cubes de sang citraté récolté chez deux malades de fièvre boutonneuse. De nombreux animaux furent inoculés soit sous la peau ou dans le derme, soit dans le péritoine, dans les veines ou dans la chambre antérieure de l'œil.

Tous les résultats furent constamment nuls. Mais il faut ajouter que les conditions se présentaient de telle manière que la récolte des produits pathologiques a été faite dans un stade assez avancé de la maladie, alors que la défervescence avait commencé,

que la température des malades était autour de 38°. Les malades se présentaient à l'hôpital d'habitude assez tard et l'on ne pouvait fixer le début de la maladie qu'avec une certaine approximation. Les liquides pathologiques étaient donc récoltés du septième au neuvième jour de la maladie, et même plus tard. Peut-être faut-il y ajouter encore les conditions peu propices dans lesquelles ce matériel a été transporté ? Peut-être faut-il incriminer encore d'autres éléments dont nous n'avons pas pu nous rendre compte suffisamment, puisque tous les résultats de cette première série d'expériences ont été nuls ?

II. — Deuxième série d'expériences

(*avec la collaboration de* G. Zotta).

L'insuccès de la transmission chez l'homme de la fièvre boutonneuse par l'inoculation du sang prélevé chez les malades de Constantza, nous a décidé à reproduire les expériences de Durand et Conseil, Brumpt, Joyeux et Piéri, Blanc et Cominopetros, sur la transmission de la maladie par la tique du chien, *Rhipicephalus sanguineus*.

Les chiens de Constantza étaient parasités par des tiques en un grand nombre; les propriétaires affirmaient qu'ils n'ont jamais observé chez leurs chiens une telle invasion par des tiques.

Sur les chiens habitant la même cour que les malades, nous avons récolté des tiques qui ont été identifiées comme *Rhipicephalus sanguineus*. Ces tiques ont été divisées en trois lots :

a) Les tiques du premier lot ont été inoculées chez deux sujets quelques jours après leur prélèvement sur les chiens.

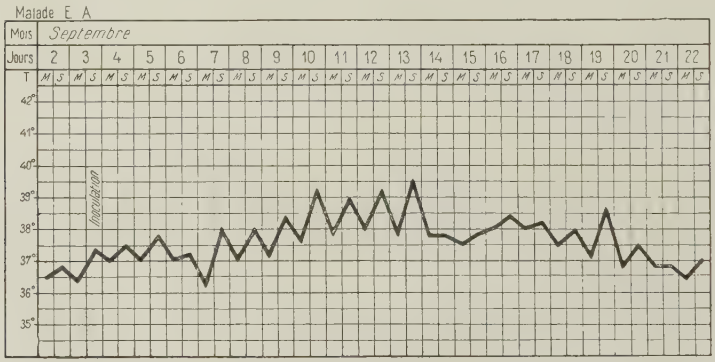
b) Les tiques du second lot ont été gardées dans le laboratoire sans nourriture, pendant deux mois, après quoi elles ont été injectées chez deux autres individus justiciables de pyrétothérapie.

c) Les tiques du troisième lot, des femelles adultes, ont été gardées dans le laboratoire où elles n'ont pas tardé à pondre. Avec les larves issues de ces œufs, nous avons inoculé 4 autres sujets, 2 par la voie sous-cutanée et intradermique, et 2 autres par la voie conjonctivale. Six mois se sont écoulés du moment de la récolte des tiques du troisième lot jusqu'à l'inoculation des larves issues de leurs œufs.

Voici les détails de ces expériences et les résultats obtenus :

A) *Expériences avec les tiques du premier lot.* — Cent exemplaires de Rhipicephalus sanguineus (4 mâles, 2 femelles adultes et 94 nymphes) ont été broyés, et le produit de ce broyage a été inoculé à 2 malades atteints de paralysie générale. Ces sujets, comme tous ceux qui ont servi à nos expériences, ont été inoculés dans le but d'essayer un traitement par la pyrétothérapie. Ce traitement a été appliqué sur des malades chez lesquels la malariothérapie n'a pas réussi (paralysie générale, démence précoce, etc.) (1).

Chaque malade a reçu le tiers du produit de broyage et l'inoculation a été faite sous la peau et dans le derme.



Courbe thermométrique n° 9.

Une des malades, E. A..., a fait après l'inoculation un petit mouvement fébrile, atteignant 37°8 le troisième jour, puis la température est revenue à la normale pour qu'après une incubation de cinq jours, la fièvre exanthématique commence à se développer. Le début a été insidieux, la température est arrivée à 39°2 le huitième jour après l'inoculation, et 39°5 le onzième jour. Elle s'est maintenue encore autour de 38°, sept jours. La maladie a duré en tout treize jours (courbe n° 9). L'éruption est apparue le quatrième jour de la maladie et a continué à se multiplier les jours suivants (quatre à cinq jours) sous forme de poussées. Les premiers éléments éruptifs sont apparus tout autour du lieu

(1) Nous tenons à remercier chaleureusement nos confrères de l'Hôpital central de Maladies mentales et nerveuses (P. Pitulesco, D. Paulian et P. Tomesco), qui ont bien voulu nous permettre d'essayer la pyrétothérapie sur leurs malades.

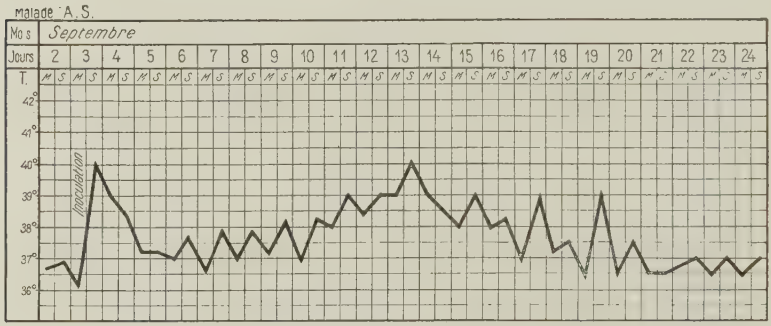
d'inoculation ; puis l'éruption, quoique discrète, s'est étendue sur le reste du corps, intéressant en même temps la paume des

Photo n° 8.

mains. L'éruption est apparue premièrement sous forme de taches rougeâtres, qui disparaissaient sous la pression du doigt. Les taches, rondes et bien délimitées, étaient séparées entre elles par de la peau saine. Quelques jours après (deux, trois ou quatre),

ces taches se transformaient en papules, nettement proéminentes. On observait très bien leur proéminence en regardant obliquement les téguments. L'aspect papuleux était remarqué surtout sur la face antérieure des jambes, et la photographie n° 8 nous donne une image assez démonstrative. Le septième et le huitième jour après le début de l'éruption, une partie des éléments éruptifs est devenue pétéchiale. Les jours suivants, l'éruption commence à pâlir pour que peu à peu elle disparaisse.

Au moment de l'apparition de l'éruption, la malade a présenté aussi une pharyngite assez intense, une légère conjonctivite et, quatre à cinq jours, des selles diarrhéiques. Toute la période fébrile, la malade a accusé des douleurs musculaires, des dou-



Courbe thermométrique n° 10.

leurs dans les muscles de la nuque, des arthralgies. Elle a supporté assez bien la maladie, a maigri beaucoup et a mis assez longtemps pour se remettre, presque deux mois. Nous avons remarqué chez cette malade un fait rencontré aussi assez souvent chez les autres malades : une fois remis, les malades engraissent rapidement, leur état général étant influencé en bien par le passage de cette maladie.

La deuxième malade, A. S..., après une incubation de six jours, a fait une maladie typique, avec un début insidieux, avec un maximum de température de 40° le onzième jour après l'injection. La durée de la maladie a été de douze jours (courbe n° 10). L'éruption, dans ce cas, a été plus abondante (photo n° 9), avec des éléments démonstratifs sur les cuisses (photo n° 10) et la paume des mains (photo n° 11). Cette malade a présenté aussi des selles diarrhéiques pendant la période fébrile. Il faut y ajou-

ter l'inflammation douloureuse des ganglions de la région axillaire correspondant au lieu d'inoculation.

Donc, l'inoculation du premier lot de tiques a donne des résultats positifs chez les deux paralytiques ; toutes les deux firent une maladie absolument typique, avec les symptômes cliniques

Photo n° 9.

de la maladie constatée à Constantza, qui n'est autre chose que la fièvre exanthématique de Marseille ou fièvre boutonneuse de A. Conor et A. Bruch, dans la transmission de laquelle Rhipicephalus sanguineus joue un rôle important.

B) *Expériences avec les tiques du deuxième lot.* — Dans ces expériences, nous nous sommes servi de tiques qui avaient été

récoltées sur des chiens deux mois auparavant. Il s'agit de 18 nymphes apportées de Constantza le 15 août et qui, le 17 octobre, étaient devenues adultes. Le broyage, comme dans tous les cas où nous avons travaillé avec des tiques, a été fait dans du bouillon, puis divisé en deux parties égales, et chaque partie a été inoculée sous la peau et dans le derme d'une malade atteinte de parkinsonisme (D. D... et S. D...).

Les deux malades ont fait une infection typique : une avec

Photo n° 16.

une période d'incubation et la durée de la maladie plus courte (D. D..., courbe n° 11), l'autre avec l'incubation et la durée de la maladie plus longue (S. D..., courbe n° 12).

Chez ces deux malades, aussi, l'éruption n'a pas été très abondante et les premiers éléments éruptifs sont apparus autour du lieu d'inoculation du produit de broyage. Les deux malades ont souffert d'arthralgies, de myalgies et surtout de douleurs dans les muscles de la nuque. Les ganglions de la région axillaire correspondant au lieu d'inoculation étaient sensibles.

Ces expériences nous montrent que le virus de la maladie que

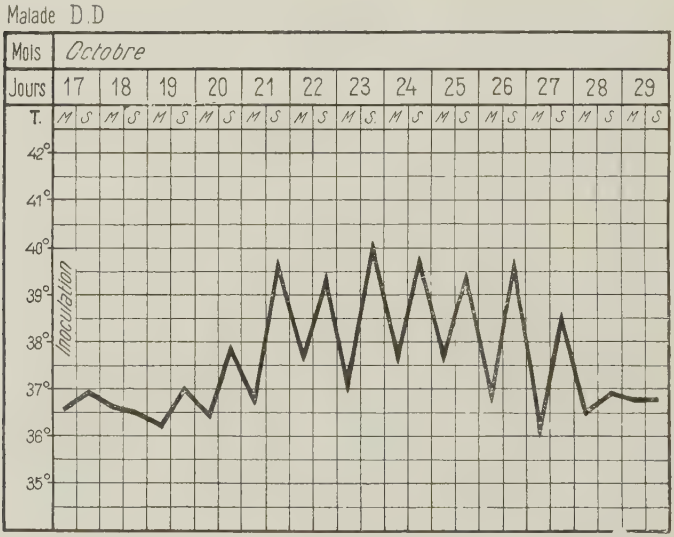
nous étudions se conserve assez bien, au moins deux mois, dans le Rhipicephalus sanguineus, et que les tiques adultes issues des larves infectées sont infectantes.

Photo n° 11.

c) *Expériences avec les tiques du troisième lot.* — Une partie des tiques femelles capturées sur des chiens à Constantza, le 15 août 1931, est conservée en tubes où les femelles ne tardent pas à pondre. Plusieurs centaines de larves issues de ces œufs

sont broyées en bouillon le 20 février 1932 (six mois après la récolte des tiques), et le produit de broyage est inoculé par voie sous-cutanée et intradermique à deux malades justiciables de pyrétothérapie, et, par voie conjonctivale, à deux autres malades.

Les deux malades inoculés sous la peau et dans le derme ont fait une fièvre exanthématique, avec une incubation assez courte (cinq à sept jours). L'éruption, sans être trop abondante, intéressait aussi la face, la paume des mains et la plante des pieds. Les malades ont eu une pharyngite assez prononcée. Un d'entre



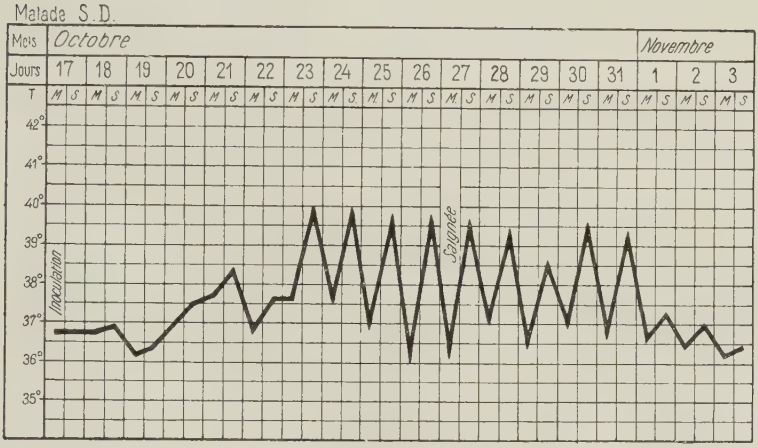
Courbe thermométrique n° 11.

eux a fait un léger délire et une maladie d'une durée plus longue (G. I..., courbe n° 13); l'autre une maladie avec une incubation plus longue et d'une durée plus courte (J. Crs..., courbe n° 14).

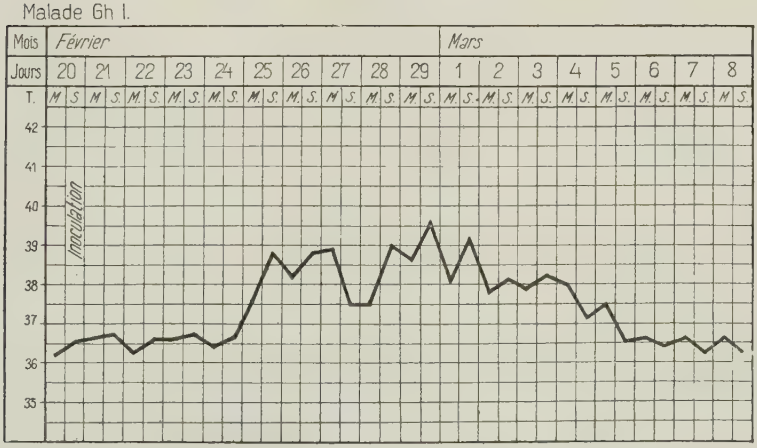
Ces recherches prouvent encore une fois la persistance assez longue du virus de la fièvre boutonneuse dans la tique Rhipicephalus sanguineus, et confirment en même temps les expériences de G. Blanc et J. Caminopetros sur la transmissibilité héréditaire du virus de cette maladie chez cette tique (Rhipicephalus sanguineus).

Les recherches d'inoculation par la voie conjonctivale nous ont donné de même des résultats positifs. Les deux malades

(G. S..., courbe n° 15, et G. D. I..., courbe n° 16) ont reçu dans l'œil quelques gouttes du broyage de larves de Rhipicephalus



Courbe thermométrique n° 12.

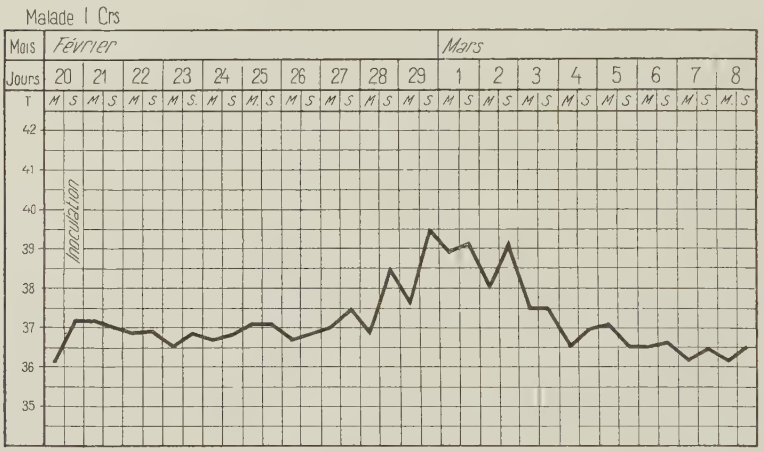


Courbe thermométrique n° 13.

sanguineus, qui a servi à l'inoculation des deux sujets dont nous avons parlé plus haut. Les deux individus ont réagi, l'un faisant une maladie assez bénigne, l'autre une infection très légère. Le premier a présenté une conjonctivite assez intense, avec de la

sécrétion, tandis que le second a eu des phénomènes plus atténués. L'éruption, sans être abondante, a été typique dans un cas, absente dans l'autre. Quoique l'éruption a été absente dans le deuxième cas, nous considérons le mouvement fébrile présenté par ce malade comme dû à la fièvre exanthématique et qu'il s'agit d'une forme fruste de cette maladie. Les autres symptômes se superposent assez bien pour qu'on puisse parler d'autre chose.

Ces expériences nous montrent que l'infection peut être obtenue par la voie conjonctivale, ce que, du premier moment, les

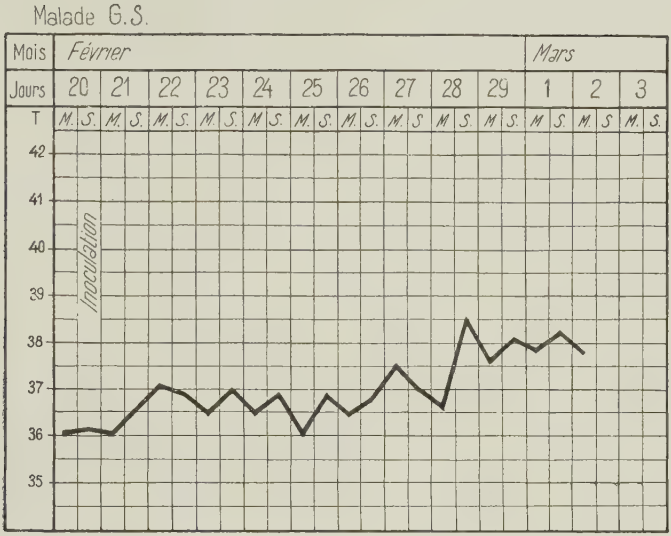

Malade I Crs
Mois
Février
Mars
Jours
20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 1 2 3 4 5 6 7 8
T
M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S
42
41
40
39
38
37
36
35
Inoculation

Courbe thermométrique n° 14.

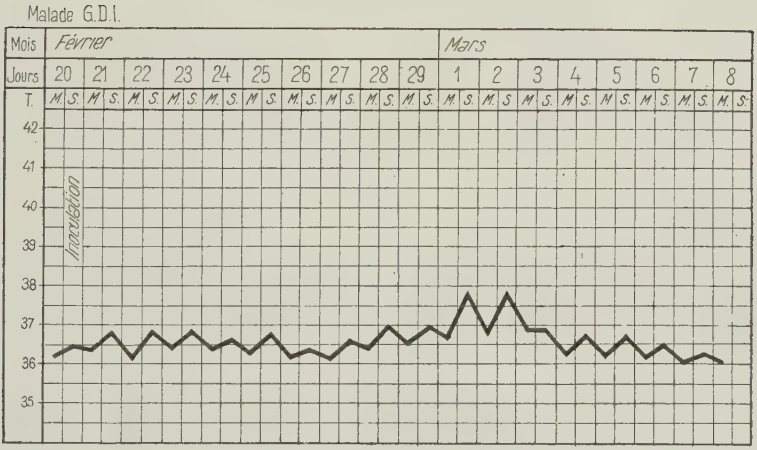
observations cliniques de D. Olmer et des autres observateurs ont fait supposer. En effet, on avait décrit chez certains malades des lésions oculaires (conjonctivite, kérato-conjonctivite, chémosis, etc.) qui précédaient de quelques jours l'apparition de la fièvre et de l'éruption. Quelquefois, l'affection oculaire était si prononcée que les malades allaient consulter des médecins oculistes, et c'est seulement l'évolution ultérieure de la maladie, l'apparition de l'éruption, qui facilitaient l'établissement du diagnostic. Des cas semblables ont été observés dans l'épidémie de Constantza.

L'absence de la tache noire sur le reste des téguments de ces malades, la constatation des lésions oculaires avant l'apparition de la fièvre, ont fait admettre que l'infection par la voie conjonc-

tivale dans la fièvre boutonneuse soit possible. La lésion ocu-



Courbe thermométrique n° 15.



Courbe thermométrique n° 16.

laire n'est autre chose que le chancre d'inoculation et remplace, dans ces cas, la tache noire de Piéri et Brugéas.

Nos expériences confirment celles de G. Blanc et J. Caminopetros.

Nous rappelons en même temps, et dans le même ordre d'idées, l'observation de L. et A. Marcon, dans laquelle ces auteurs relatent un cas de fièvre exanthématique après l'inoculation intra-oculaire accidentelle de sang de tique. Il s'agit d'un cultivateur qui, en écrasant les tiques de son chien entre les ongles, reçoit une goutte de sang à l'œil droit. Le lendemain, il présente de la kérato-conjonctivite, puis du chémosis, et les jours suivants, les symptômes caractéristiques de la fièvre exanthématique se sont déroulés.

III. — Troisième série d'expériences.

Une fois la maladie reproduite expérimentalement chez l'homme par l'inoculation de broyage de Rhipicephalus, nous avons repris les recherches de la première série d'expériences : les essais de passage de l'homme à l'homme à l'aide du sang récolté pendant la période fébrile. Et cette fois-ci, les résultats ont été positifs. Nous ajoutons que des recherches semblables, avec des résultats positifs, ont été faites par Claude et Coste, D. et J. Olmer, G. Blanc et I. Caminopetros, etc.

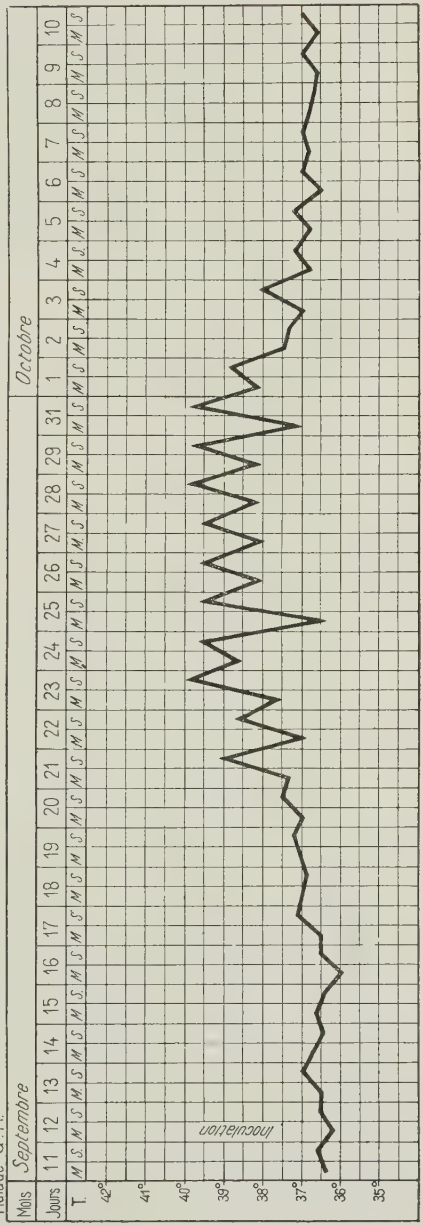
Nous reproduisons quelques observations des malades avec la fièvre exanthématique expérimentale provoquée par l'inoculation du sang récolté chez un malade. Ces observations nous semblent importantes par le fait qu'elles nous ont donné l'occasion de constater une série de faits dignes d'être mentionnés.

a) Nous sommes partis des malades E. A... et A. S..., qui ont fait la maladie par suite d'une injection de broyage de Rhipicephalus sanguineus. Les deux malades ont été saignés le 12 septembre 1931, le quatrième et le cinquième jour de température. Immédiatement après la récolte, 5 centimètres cubes du sang de la malade E. A... ont été inoculés sous la peau et dans le derme de la malade G. M... (courbe n° 17), 5 centimètres cubes du sang de la malade A. S... ont été inoculés sous la peau et dans le derme de la malade M. H... (courbe n° 21). De même, 2 cmc. 1/2 du sang de la malade A. S... ont été inoculés sous la peau et dans le derme d'une autre malade, E. P... (courbes n^{os} 30 et 31), malade qui avait été inoculée encore une fois, le 25 août, avec 10 centimètres cubes de sang prélevé chez les malades de Constantza.

Nous procédons ainsi pour faire l'injection : la seringue une

fois chargée, nous pénétrons dans le tissu cellulaire sous-cutané, puis, par un mouvement de bascule, nous dirigeons la pointe de l'aiguille vers les téguments et poussons jusqu'à ce que la pointe de l'aiguille arrive dans le derme, le plus près possible de la surface de la peau. Puis nous effectuons l'injection. Nous retirons peu à peu la seringue en continuant à injecter le sang; ainsi, une partie est inoculée dans le tissu cellulaire sous-cutané et l'autre partie dans le derme.

La malade G. M... commence à fébriciter légèrement le soir (37°2) du cinquième jour après l'inoculation. En même temps, nous constatons, au lieu où l'injection a été faite dans le derme, l'apparition d'une tache rouge, légèrement proéminente, Le lendemain, la tache est plus évidente et l'aspect papuleux encore plus caractéristique. La température varie trois jours entre 37° et 37°5, et tout ce temps on n'a pu découvrir aucun autre élément éruptif sur le reste des téguments. Le neuvième jour de l'inoculation, donc le quatrième jour du début de l'apparition de la fièvre, la malade fait 39° de température et, en même temps, deux autres taches rougeâtres apparaissent dans la région inoculée, et une



COURBE THERMOMÉTRIQUE n° 17.

dizaine sur le reste du corps. La couleur des taches est rouge et elles disparaissent sous la pression du doigt. Deux jours

Photo n° 12.

plus tard, l'éruption est plus accentuée, une série nouvelle d'éléments éruptifs sont apparus sur le corps, les bras, les membres inférieurs, la région cervicale, et quelques-unes sur la

face. Les jours suivants, l'éruption est encore plus abondante, surtout sur les fesses (photo n° 12), sur les bras, au lieu d'inoculation, sur la paume et le dos des mains, sur la plante des

Photo n° 13.

pieds, sur la face et la peau du crâne (photo n° 13). En même temps, l'éruption a pris le caractère nettement papuleux, ne disparaît plus sous la pression, sa couleur est devenue plus foncée.

Les éléments éruptifs font une saillie assez prononcée, légèrement rénitente à la palpation, donnant l'impression de petits nodules dans la peau. On a bien cette impression quand on

Photo n° 14.

regarde la photographie prise au moment de la contraction des muscles fessiers (photo n° 14).

La première tache éruptive apparue au lieu d'inoculation est

beaucoup plus grande que celles apparues ultérieurement sur le reste du corps ; elle a un diamètre 3 à 5 fois plus grand que le reste des papules et est d'une couleur plus foncée (photo n° 15). *Elle correspond à la tache noire de l'infection spontanée.*

Le sixième jour après le début de l'éruption, la malade pré-

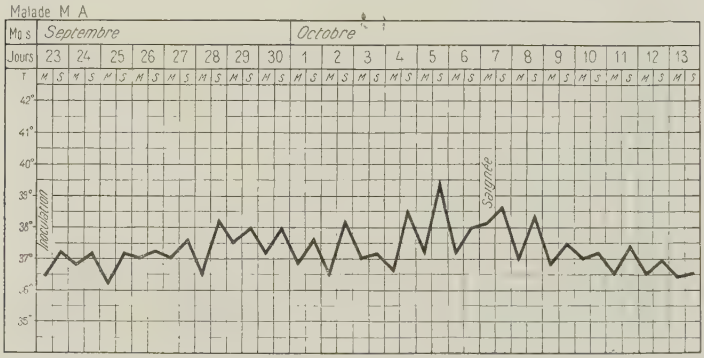
Photo n° 15.

sente de la diarrhée et est dans un état d'asthénie prononcée. La diarrhée persiste trois jours, puis l'état général commence à s'améliorer, la température baisse en lysis, la couleur des taches devient lie-de-vin.

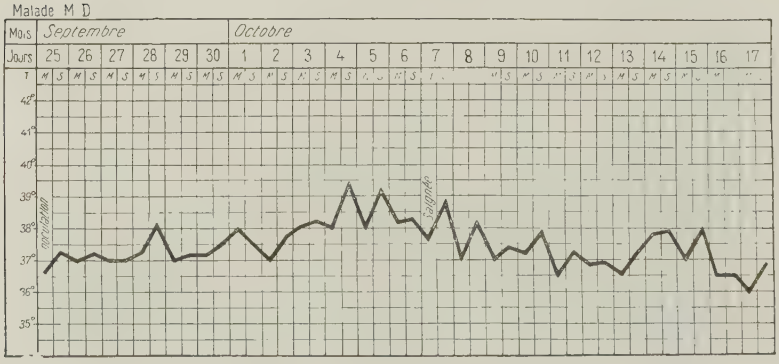
La maladie a duré approximativement quatorze jours, et la malade s'est remise complètement.

Les deux autres malades (M. H... et F. P...), inoculées avec du sang de A. S..., n'ont pas réagi.

b) Nous avons fait, après, des essais de transmettre la maladie plus loin en partant de la malade G. M... Nous avons saigné cette malade les 23 et 25 septembre, les cinquième et sep-



Courbe thermométrique n° 18.



Courbe thermométrique n° 19.

tième jours de la maladie, en pleine fièvre et éruption. Avec le sang prélevé le 23 septembre, nous avons inoculé deux malades : une (M. A...), avec 10 centimètres cubes sous la peau et dans le derme; la deuxième (A. G...), avec 5 centimètres cubes dans les veines. Avec le sang récolté le 25 septembre, nous avons inoculé quatre malades: une malade (M. D...) a reçu 10 centimètres cubes dans les veines; un malade (D. A...), 7 centimètres cubes sous la

peau; un autre (N. S...), 5 centimètres cubes sous la peau, et une autre malade (M. H...), 7 centimètres cubes sous la peau. Cette dernière malade (M. H...) avait été inoculée encore une fois le

Photo n° 16.

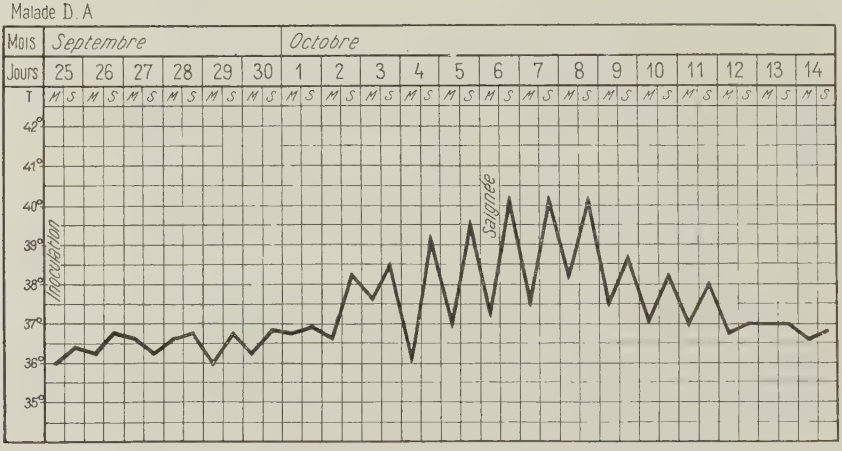
12 septembre, avec 5 centimètres cubes du sang de la malade A. S..., et n'avait pas réagi.

La malade A. G..., inoculée dans les veines avec 5 centimètres cubes, et le malade N. S..., inoculé sous la peau avec 5 centimètres cubes, n'ont pas réagi.

La malade M. A..., inoculée sous la peau et dans le derme avec 10 centimètres cubes, et la malade M. D..., inoculée dans les veines avec 10 centimètres cubes, ont fait une maladie avec éruption typique, dont les courbes de température se superposent presque (M. A..., courbe n° 18; M. D..., courbe n° 19).

La malade M. A... a présenté une éruption plus abondante, qui intéressait en même temps la paume des mains, les membres inférieurs, etc.

En plus, elle a eu des nausées, des vomissements, des vertiges, de la céphalée, des arthralgies et des myalgies. *Nous avons*



Courbe thermométrique n° 20.

observé aussi chez cette malade que le premier élément éruptif est apparu là où l'inoculation intradermique a été faite, que l'apparition de cette tache précédait d'un jour ou deux le début de l'ascension fébrile et qu'elle dépassait en taille toutes les autres maculo-papules qui sont apparues ultérieurement (photo n° 16). *Cette lésion correspond à la tache noire et constitue le chancre d'inoculation de cette infection.*

La malade M. D... a fait une éruption qui s'étendait sur tout le corps, mais qui était moins abondante.

Le malade D. A..., inoculé sous la peau avec 7 centimètres cubes de sang, a fait une maladie, avec une période d'incubation de sept jours, avec une durée de dix jours (courbe n° 20), avec une éruption généralisée sans être très abondante (photo n° 17);

avec des éléments éruptifs sur la face, sur les paupières, sur les ailes du nez, sur la paume des mains et les plantes des pieds, etc.

Quant à la malade M. H..., réinoculée sous la peau le 25 sep-

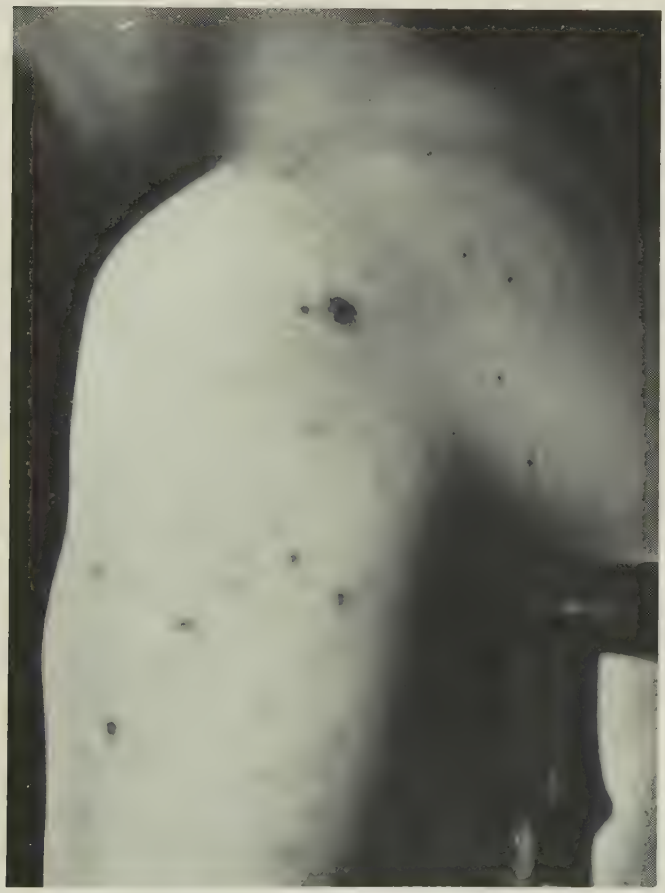
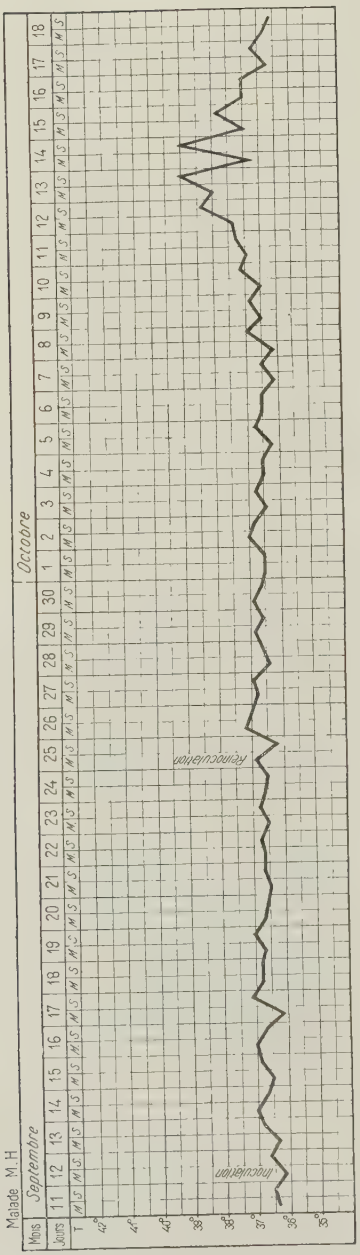


Photo n° 17.

tembre avec 7 centimètres cubes de sang, elle a fait une maladie avec une période d'incubation de quinze à seize jours, avec une durée de cinq à six jours; avec quelques éléments éruptifs, très rares, mais assez caractéristiques (courbe n° 21). Nous reviendrons sur cette malade à l'occasion de la discussion sur l'immu-



COURBE THERMOMÉTRIQUE n° 21.

nité dans la fièvre exanthématique ou la fièvre boutonneuse (deuxième mémoire).

Cette série d'expériences prouve entre autres *qu'on peut reproduire l'infection soit que l'inoculation ait été faite par la voie sous-cutanée, soit qu'elle ait été faite par la voie intradermique ou dans les veines.*

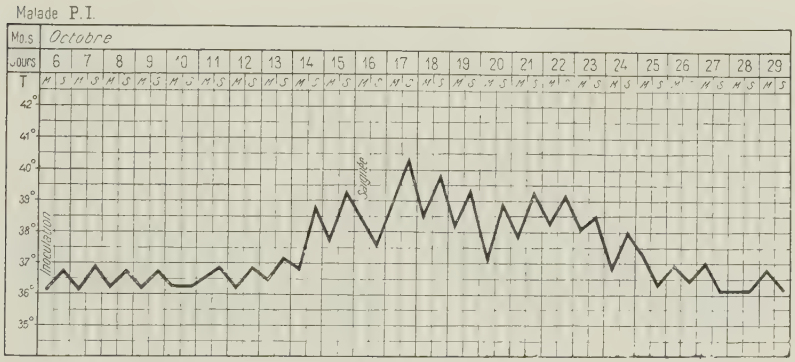
c) Nous avons continué la série des passages de l'homme à l'homme à l'aide du sang.

Le malade D. A... a été saigné le 6 octobre, donc le quatrième jour de la fièvre, 10 centimètres cubes de sang ont été inoculés sous la peau et dans le derme du malade An. D... ; une autre partie du sang a été centrifugée et 7 centimètres cubes du dépôt globulaire ont été inoculés chez un autre malade, P. I..., sous la peau et dans le derme. Avec le plasma obtenu par centrifugation, nous avons injecté deux autres sujets : l'un, N. C. G..., a reçu 7 centimètres cubes ; l'autre, I. Cp..., 6 centimètres cubes.

Le malade An. D... a présenté, deux jours après l'inoculation, une tache rouge dans la région inoculée intradermique. La tache est disparue quarante-huit heures plus tard. Aucun autre symptôme ne s'est plus ajouté à cette première manifestation. Donc le résultat de la transmission avec le sang total, dans ce cas, a été négatif.

Le malade P. I..., inoculé avec le dépôt globulaire obtenu par centrifugation, a fait une maladie typique, avec une période d'incubation de sept jours, avec une durée de l'état fébrile de onze

jours, avec le début insidieux, avec la chute de la température en lysis (courbe n° 22), etc. Le malade, comme nous l'avons dit plus haut, a été inoculé le 6 octobre. Le 7 octobre, une tache est apparue au lieu de l'inoculation intradermique. Cette tache s'est agrandie et, le 10 octobre, elle était plus étendue et d'un aspect papuleux. Le 12 octobre, 3 autres taches sont apparues dans la même région, tout autour du premier éléments éruptif. Il faut y ajouter que la température a commencé à croître trente-six heures à peine après l'apparition de ces éléments éruptifs, et que c'est seulement quatre jours plus tard, le 16 octobre, que l'éruption s'est généralisée. Les jours suivants, l'éruption s'est étendue, est devenue plus abondante, a intéressé la paume des



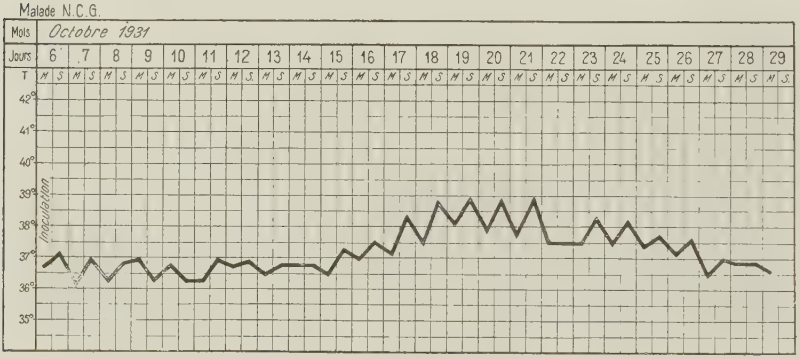
COURBE THERMOMÉTRIQUE n° 22.

mains, la plante des pieds, etc. Le malade a présenté en plus une pharyngite intense et, à l'examen de la gorge, nous avons remarqué quelques taches d'une teinte rouge foncée sur le voile du palais. Sans présenter un véritable état de stupeur, le malade a fait une forme asthénique, avec une langue sèche, légèrement brûlée. L'éruption est devenue pétéchiale et a persisté longtemps dans la convalescence, quoique l'état général se soit amélioré vite après la chute de la température.

Le malade N. C. G..., inoculé avec 7 centimètres cubes de plasma, a fait une maladie caractéristique, mais moins typique que P. I..., avec une période d'incubation de neuf à dix jours, la température ne dépassant pas 38°9 (courbe n° 23) et l'éruption étant très discrète. Le quatrième jour d'inoculation, la tache caractéristique est apparue au lieu d'inoculation. Elle s'est

agrandie les jours suivants. La température a commencé à croître seulement six jours plus tard, et les quelques taches discrètes — auxquelles toute l'éruption a été réduite — quarante-huit heures après l'installation de la température. En général, une maladie très légère, avec une éruption très discrète, qui aurait très bien pu passer inaperçue si le malade n'avait pas été suivi et examiné avec une attention spéciale.

Le malade I. Cp..., inoculé avec 6 centimètres cubes de plasma sanguin, réagit tout à fait à part, c'est-à-dire que sa maladie se réduit à quelques symptômes très atténués : le sixième jour de l'injection, une tache rouge apparaît dans la région inoculée, suivie de 3 autres taches dans la même région quatre jours



Courbe thermométrique n° 23.

plus tard. C'est seulement vingt-quatre heures plus tard que la température du malade commence à croître, la fièvre dure seulement trois jours et ne dépasse pas 38°9. Donc une forme de maladie très bénigne et on peut dire sans éruption.

Ces expériences montrent entre autres la différence individuelle de réaction vis-à-vis de la même infection et que *l'on peut obtenir des résultats positifs, que l'on inocule du sang total ou du plasma sanguin, ou du dépôt globulaire obtenu par centrifugation.*

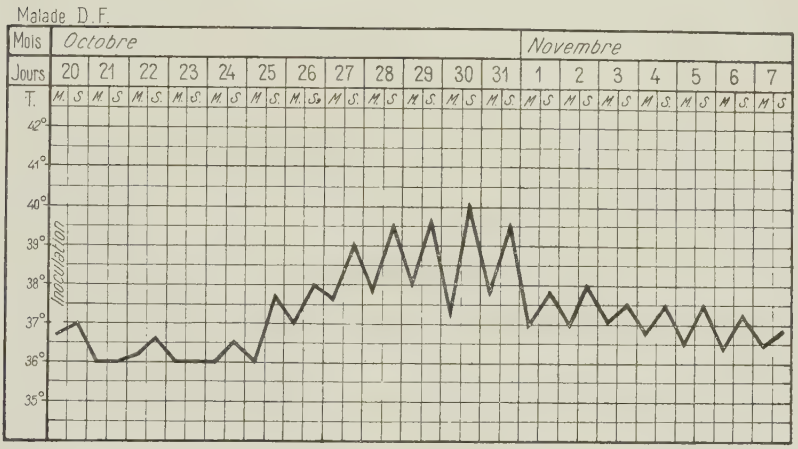
Il faut y ajouter que, dans toutes nos expériences, nous nous sommes servi de sang citraté.

d) Continuant les essais de passage de l'infection de l'homme à l'homme, les cas d'insuccès se sont multipliés.

Nous avons saigné le malade P. I... le 16 octobre, dans les

premiers jours de la maladie, en pleine éruption. Nous pourrions dire, en nous basant tant sur les recherches des autres auteurs que sur les nôtres personnelles, que nous nous trouvions dans les conditions les plus propices pour réussir la tranmission de la maladie. 10 centimètres cubes de sang ont été inoculés dans les veines du malade D. En..., et 10 autres centimètres cubes sous la peau et dans le derme du malade B. Gh... Les résultats ont été complètement nuls.

Une autre malade, M. H..., a été saignée le 16 octobre, alors qu'elle se trouvait au commencement de la défervescence. 10 cen-

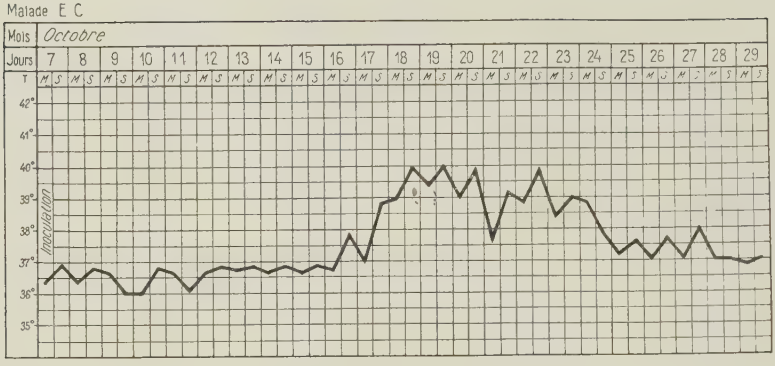


Courbe thermométrique n° 24.

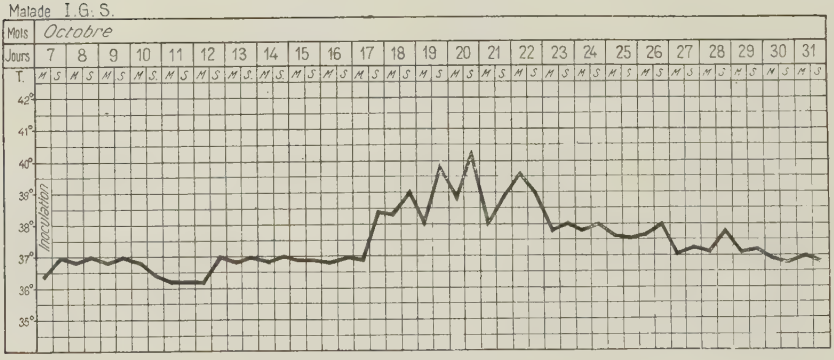
timètres cubes de sang inoculés chez une autre malade, A. G..., sont restés sans conséquence : absence complète de tout symptôme morbide.

Le malade N. C. G... a été saigné le cinquième jour de maladie, le 20 octobre; avec son sang, nous avons injecté dans les veines un autre sujet, D. F... Il a fait une maladie d'une gravité moyenne, avec une éruption discrète (courbe n° 24). Les essais faits pour les passages ultérieurs ont donné des résultats négatifs (P. V...).

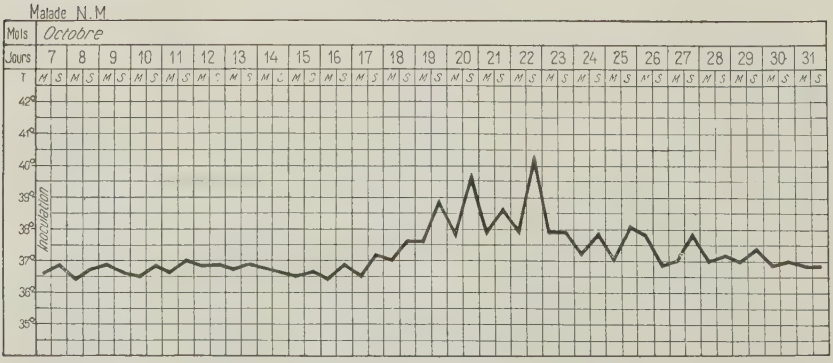
e) Partant de la malade S. D..., qui avait été inoculée avec du broyage de Rhipicephalus et qui avait fait la maladie, nous avons obtenu des résultats négatifs en inoculant du sang sous la peau et dans le derme de deux autres sujets : V. Ng... et A. D. N... La saignée et l'inoculation ont été pratiquées le 27 octobre, donc



Courbe thermométrique n° 25.



Courbe thermométrique n° 26.



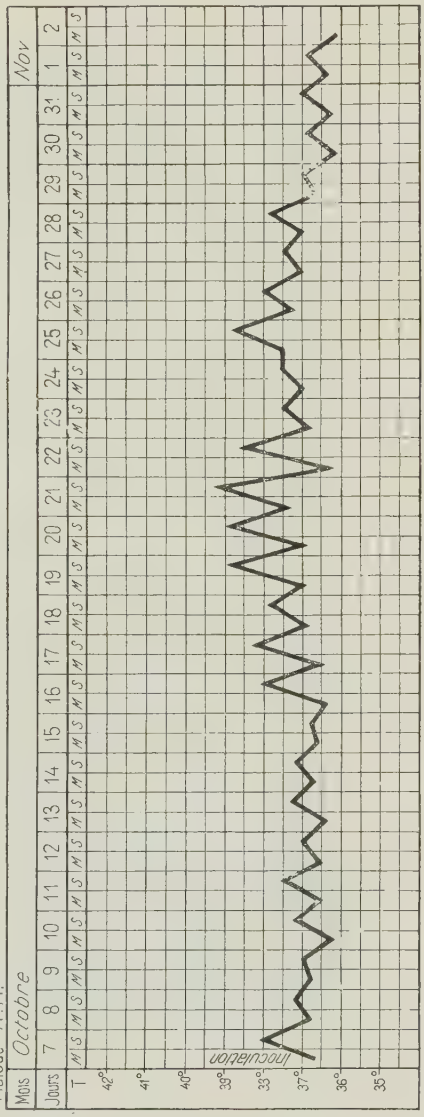
Courbe thermométrique n° 27.

quand S. D... était en pleine fièvre, le septième jour de la maladie.

f) Les expériences reproduites plus haut nous montrent qu'au fur et à mesure que le nombre des passages croît, le nombre des insuccès croît aussi. Par ces passages à l'homme, la maladie s'atténue, très souvent la période d'incubation se prolonge, l'éruption devient très discrète ou disparaît. Quelquefois, on obtient des résultats négatifs du premier passage.

Chez les singes inférieurs (Macacus Rhesus), comme nous verrons plus tard, nous avons constaté le même phénomène : *par le passage, l'activité du virus de la fièvre exanthématique s'épuise jusqu'à disparition complète.*

C. Ionesco-Mihaiesti, A. Tupa, B. Wisner et I. Mesrobeanu ont décrit un phénomène semblable observé avec le virus de la polyomyélite. Les différentes souches de virus polyomyélitique isolées pendant l'épidémie roumaine de 1927-1928 présentaient le caractère de l'atténuation très rapide de leur virulence, dans les passages de singe à singe. En employant un virus polyvalent, réalisé par le mélange des différentes souches, ces auteurs ont obtenu des résultats très intéressants : le pouvoir pathogène de ce virus polyvalent augmente rapidement au



COURBE THERMOMÉTRIQUE n° 28.

cours des passages, la maladie prend une allure très grave, etc.

Nous avons cherché à appliquer cette méthode dans la fièvre exanthématique de Marseille.

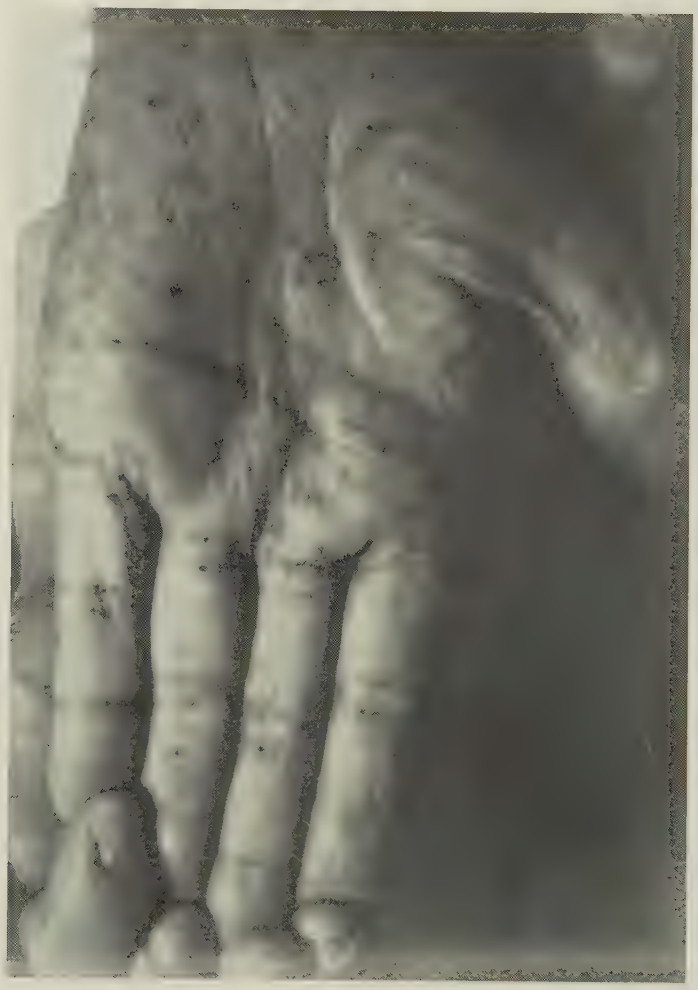


Photo n° 18.

Deux malades, M. A... et M. D..., qui ont fait une maladie assez légère, avec une température ne dépassant pas 39°, ont été saignés le même jour (les quatrième et cinquième jours de la

maladie). Le sang récolté, citraté, mélangé en parties égales, est centrifugé.

Photo n° 19.

Un sujet, E. C..., reçoit sous la peau et dans le derme 10 centimètres cubes du dépôt globulaire de centrifugation ; un autre, I. G. S..., reçoit 8 centimètres cubes du même dépôt; un troisième

sujet, N. M..., est inoculé avec 10 centimètres cubes du dépôt globulaire, et enfin un quatrième malade, A. M..., reçoit 10 centimètres cubes du plasma sanguin obtenu par centrifugation.

Ces quatre individus ont fait une maladie sérieuse, avec un tableau clinique dépassant en gravité l'infection provoquée chez les malades inoculés avec le broyage de Rhipicephalus sanguineus, dont le sang nous a servi pour les inoculations du premier

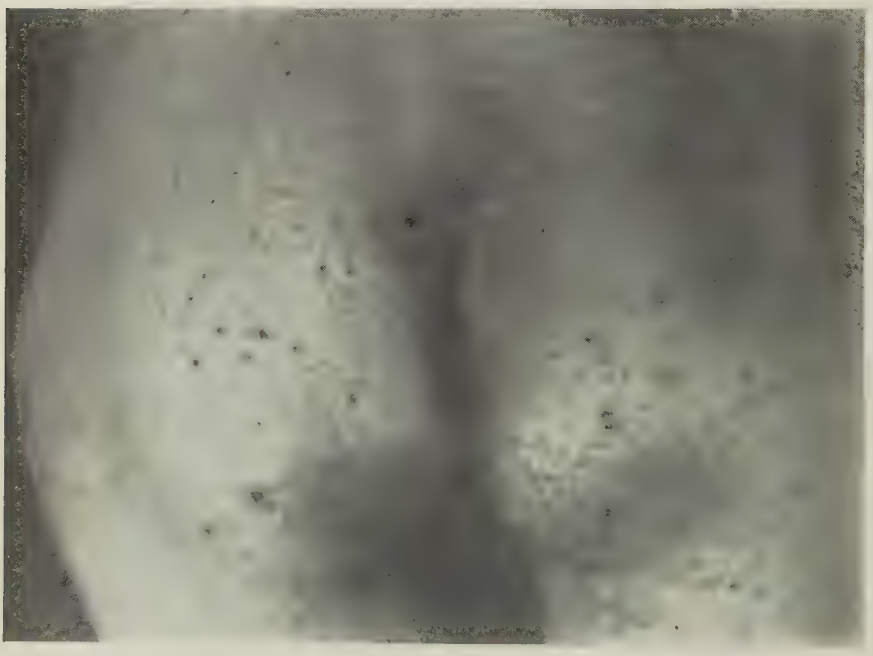


Photo n° 20.

passage. La maladie a duré en moyenne douze jours (courbes n^{os} 25, 26, 27 et 28).

Le malade E. C... a présenté une éruption pétéchiale généralisée rappelant l'éruption du typhus exanthématique (photos n^{os} 18, 19 et 20).

Chez le malade A. M..., le premier élément éruptif est apparu là où nous avons pratiqué l'injection intradermique, dans la région paraombilicale. La photo n° 21 *nous montre quelle différence de taille il y a entre cette tache et les autres papules éruptives. On a l'impression d'une véritable tache noire.*

Les trois premiers malades (E. C..., I. G. S... et N. M...) ont été saignés le même jour, le cinquième jour de fièvre. Le sang de ces malades, mélangé en parties égales, est inoculé sous la peau et dans le derme de deux autres individus (T. P... et F. P...), chacun recevant 10 centimètres cubes. Le malade T. P... a fait une maladie au moins tout aussi grave que les trois autres, la fièvre durant

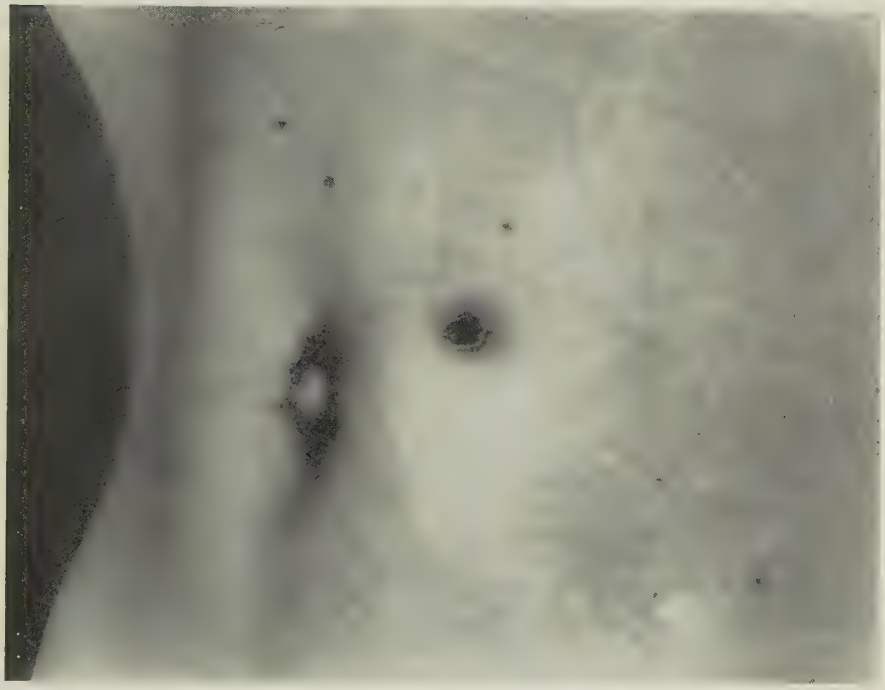
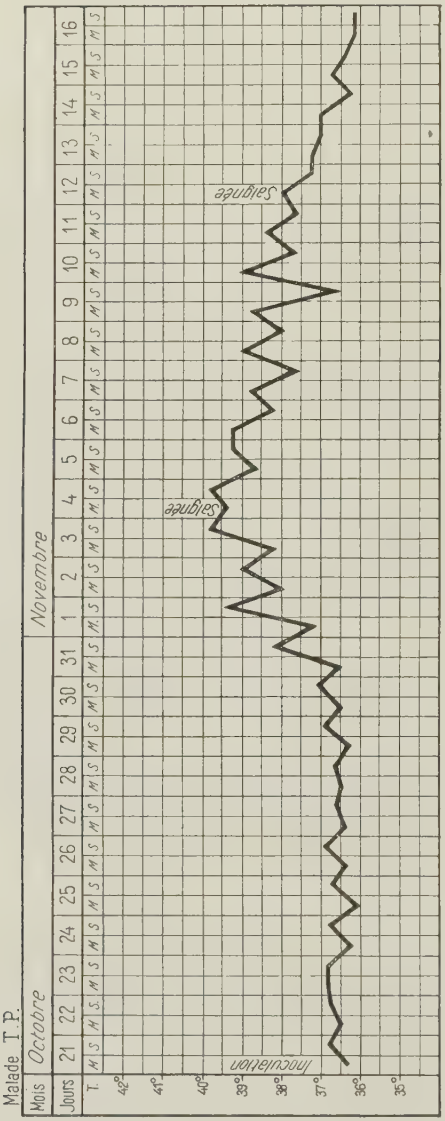


Photo n° 21.

treize jours, avec une courbe de température (courbe n° 29) et une éruption des plus caractéristiques. Ce malade représentait le cinquième passage du virus, et nous avons obtenu une maladie au moins tout aussi typique que celle provoquée par l'inoculation de Rhipicephalus sanguineus. Et nous devons encore ajouter, ce qui n'est pas sans importance, que jamais, dans nos expériences, nous n'avons dépassé la quantité de 10 centimètres cubes de sang par injection, tandis que les autres expérimentateurs sont allés jusqu'à 30 centimètres cubes et même plus.

L'histoire clinique de l'autre malade, F. P..., nous semble encore plus intéressante à relater. Cette malade a reçu, le 25 août, sous la peau et dans le derme, 10 centimètres cubes de sang récolté à Constantza. Donc, elle faisait partie de notre première série d'expériences. Le résultat de l'inoculation avait été considéré comme négatif, quoique la malade ait eu un petit mouvement fébrile le quatorzième et le quinzième jour de l'inoculation (38°2 le soir seulement) (courbe n° 30). Le 12 septembre, elle a été inoculée de nouveau, et toujours dans le derme et sous la peau, avec 2 cmc. 1/2 de sang récolté chez la malade A. S... L'injection n'a pas eu de suite : pas le moindre symptôme morbide.

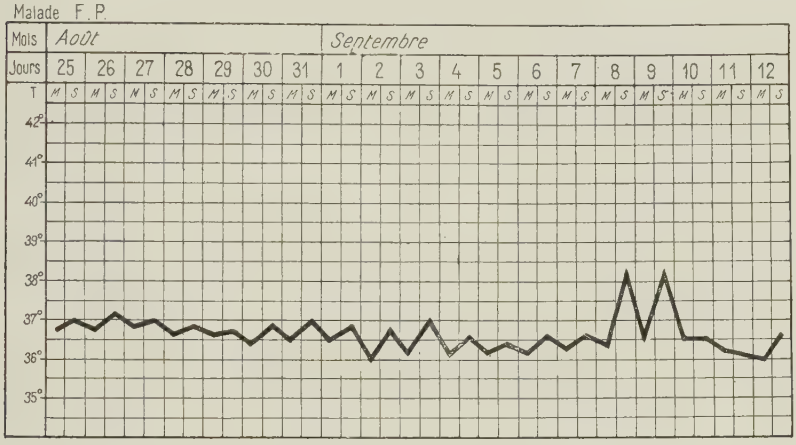


Courbe thermométrique n° 29.

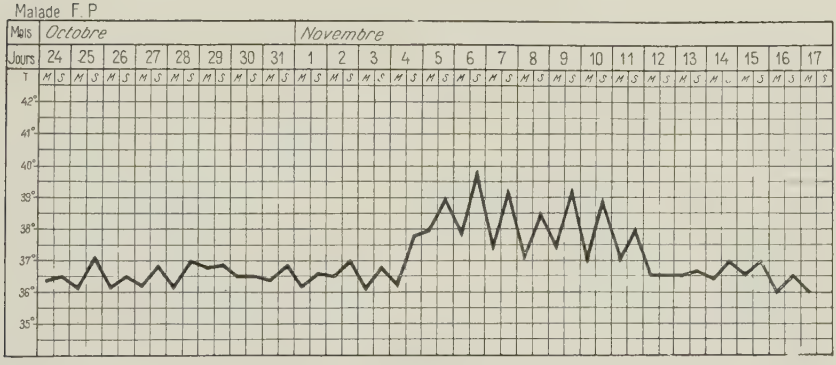
Le 21 octobre, la malade reçoit de nouveau, par injection intra- et hypodermique, 10 centimètres cubes du mélange de sang dont il a été question plus haut. 13 jours après l'injection, la malade a fait une maladie typique (courbe n° 31), alors qu'on avait le droit de croire que la malade ne devait pas réagir ou en tout cas faire une maladie fruste. L'ébauche d'infection après la première inoculation, le 25 août, aurait dû créer un certain état d'immunité. La résistance aurait dû croître après la deuxième injection. Le mélange de virus, avec

tout cela, a vaincu la résistance créée par les injections antérieures et la malade a fait une infection assez sérieuse.

On obtient donc, avec le mélange de virus, ce qu'une seule souche de virus ne semble pas réussir à produire.



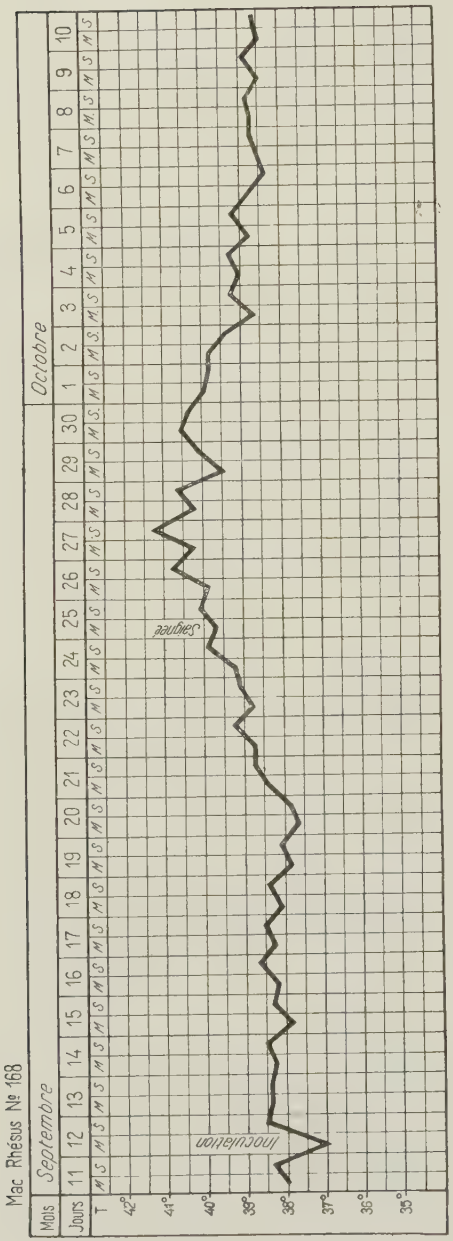
Courbe thermométrique n° 30.



Courbe thermométrique n° 31.

IV. — Quatrième série d'expériences.

Dans cette série d'expériences, nous avons cherché à transmettre la fièvre exanthématique aux singes inférieurs. D. Olmer et Burnet furent les premiers à transmettre la fièvre exanthématique aux singes inférieurs, en partant du sang des malades.



Courbe thermométrique n° 32.

Leurs expériences ont été répétées par Burnet et Durand, Blanc et Caminopetros, etc.

Nos expériences ont porté sur des Macacus Rhesus et Macacus Cynomolgus. Nous avons confirmé leurs expériences. Les singes inférieurs sont sensibles à l'infection. La maladie, chez les singes, se traduit par de la fièvre, la perte de l'appétit dans la période fébrile, une certaine tristesse, du malaise. Nous n'avons jamais rencontré de l'éruption.

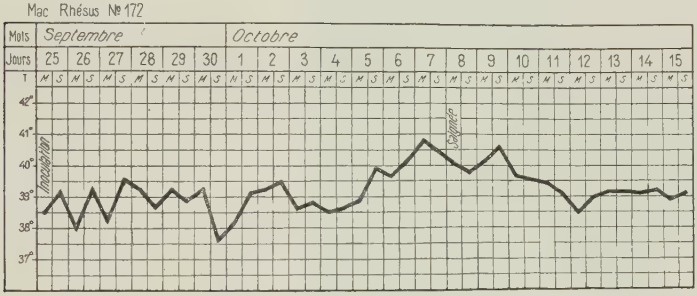
Le fait que la maladie fébrile provoquée chez les singes était une fièvre exanthématique a pu être prouvé du moment que le passage du singe à l'homme a reproduit la maladie type.

Nous relatons quelques expériences démonstratives :

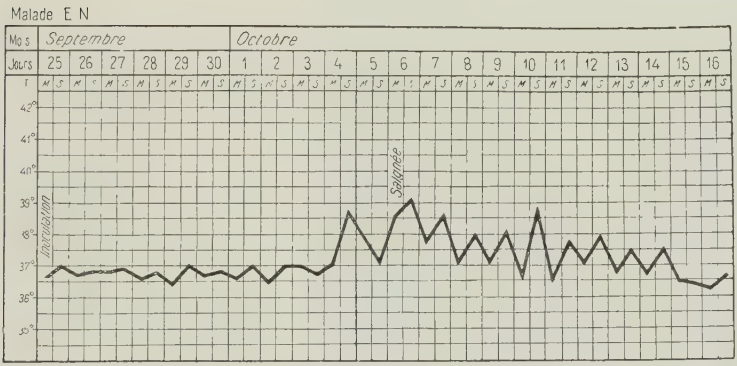
Macacus Rhesus n° 168 reçoit, le 12 septembre, sous la peau et dans le derme, 5 centimètres cubes de sang citraté prélevé chez la malade E. A... La courbe de température n° 32 nous donne l'image de l'évolution de la maladie chez ce singe. L'incubation a été de dix jours, la durée de la maladie de quatorze jours.

Ce singe est saigné le 25 septembre, le troisième jour de température. Le sang récolté sert à inoculer : *a)* un autre singe (Macacus Rhesus

n° 172), et *b)* une malade, E. N... Le singe en reçoit 4 centimètres cubes et la malade 4,5 cc., tous les deux par injection hypo- et intradermique. *Les courbes de température n° 33 pour le singe et n° 34 pour la malade nous prouvent la possibilité du passage de la maladie du singe au singe, et que la maladie du singe était bien de la fièvre boutonneuse, car l'on reproduisait chez l'homme*



COURBE THERMOMÉTRIQUE n° 33.



COURBE THERMOMÉTRIQUE n° 34.

l'infection type par l'injection du sang prélevé chez un singe malade.

Nous voulons insister un peu plus sur l'observation de la malade E. N..., qui avait reçu une injection de 4,5 cc. de sang récolté chez le Macacus Rhesus n° 168. On verra, dans cette observation, la succession des symptômes locaux consécutifs à une inoculation dans le derme.

Cette malade a été inoculée le 25 septembre. Le troisième jour de l'injection, la malade a présenté une tache rouge au point de l'inoculation intradermique. Le lendemain, cette tache est devenue rouge foncé, prenant en même temps l'aspect maculo-papuleux. Le 30 septembre, donc cinq jours après l'injection, trois autres papules apparurent dans la même zone, mais plus petites. Trois jours plus tard, les éléments éruptifs s'étaient multipliés, formant une couronne autour de la première papule (photo n° 22). Pendant tout ce temps, la température de la malade a été normale et aucun autre élément éruptif ne fut découvert sur le reste de la surface du corps.

Photo n° 22.

Le 4 octobre, neuf jours après l'inoculation, la malade commence à fébriciter (38°7). Deux jours plus tard, l'éruption caractéristique commence à apparaître sous forme de poussées sur les différentes régions de la peau. L'éruption, sans être trop abondante, intéresse aussi la paume des mains. En même temps, le premier élément éruptif apparu a subi des transformations et a été bientôt remplacé par une escarre noire (photo n° 23). En convalescence, cette escarre tombe (photo n° 24), laissant à sa place une cicatrice nacrée.

L'impression qu'on a eue, en suivant l'évolution des symptômes

locaux consécutifs à une injection intradermique de virus de la fièvre boutonneuse, est *qu'on a affaire à une multiplication locale de virus. Cette multiplication locale produit les modifications tissulaires qui conduisent à la formation de la tache noire et à l'apparition de cette couronne d'éléments éruptifs tout autour.* La couronne peut être absente ou être représentée seulement par quelques maculo-papules. Quel que soit le nombre de ces taches, leur apparition précède le plus souvent de quelques jours le début de l'élévation thermique (voir aussi les photos nos 15, 16 et 21).

Photo n° 23.

Dans la maladie spontanée, aux modifications tissulaires produites par le virus de la maladie s'ajoutent les troubles provoqués par l'infection secondaire et peut-être par une substance toxique produite par le Rhipicephalus sanguineus.

En conclusion, nous fondant sur les expériences et les observations faites, nous nous croyons justifié de considérer la tache noire, dans la fièvre boutonneuse ou la fièvre exanthématique de Marseille, comme un chancre d'inoculation de cette infection.

La malade E. N... est saignée le 6 octobre, l'inoculation de son sang à deux sujets (I. O... et P. M...) est restée sans résultat.

Ces expériences d'inoculation aux singes inférieurs et de réinoculation à l'homme ont été répétées avec le même résultat. Nous nous limitons à donner seulement les courbes de température,

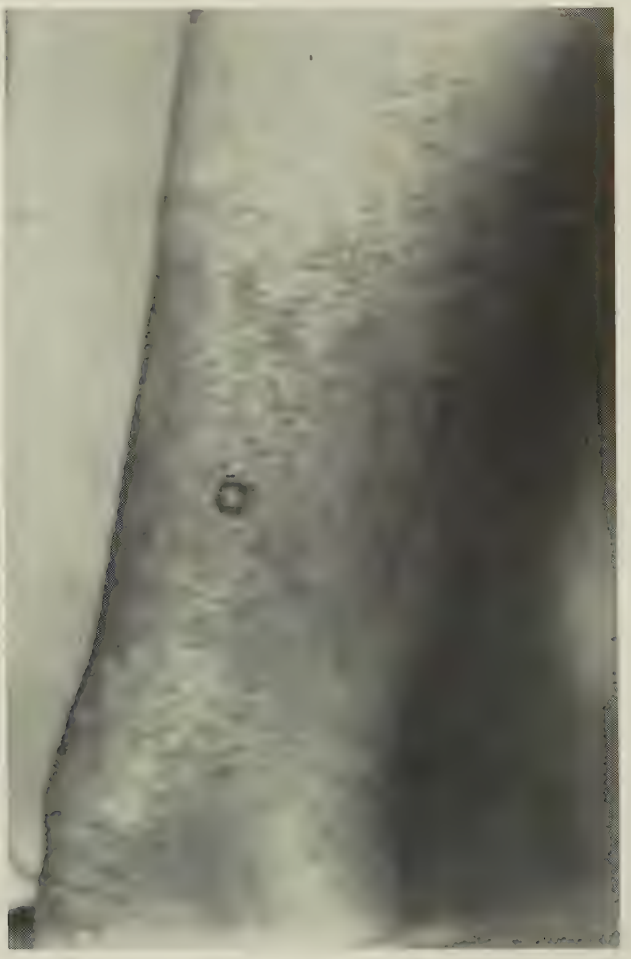


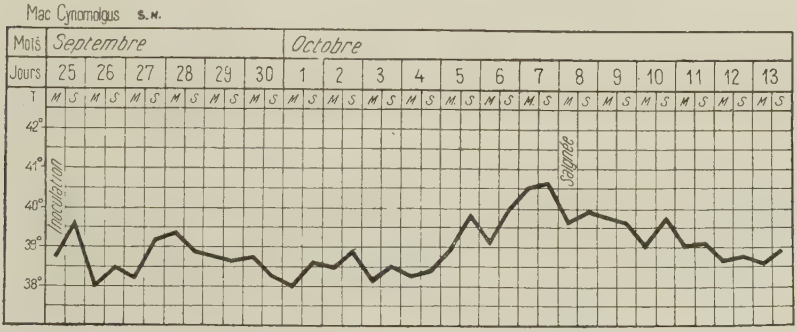
Photo n° 24.

sans insister sur les détails (courbes n^{os} 35, 35 *bis*, 36, 37 et 38).

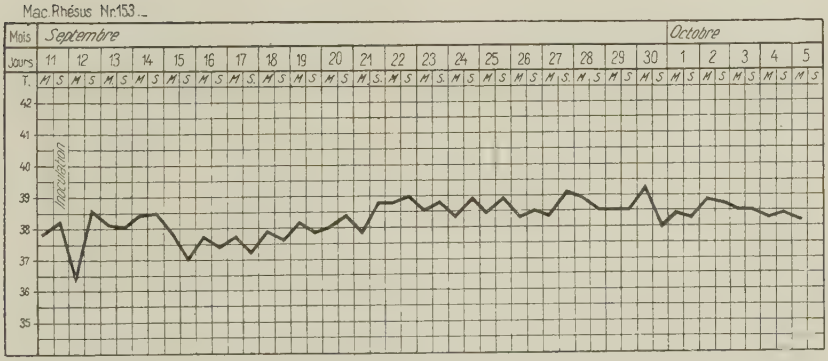
On y constatera surtout la différence individuelle de réaction, l'atténuation du virus par passage chez le singe et chez l'homme.

V. — Cinquième série d'expériences.

Cette série d'expériences comprend les essais de transmission de la maladie aux animaux de laboratoire : souris, rats, cobayes, poules, spermophiles et chiens.

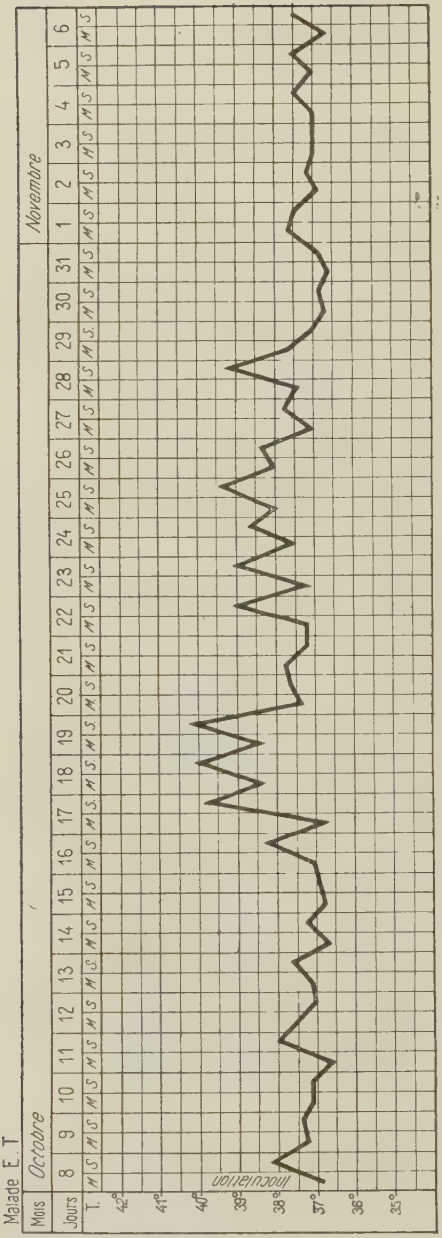


COURBE THERMOMÉTRIQUE n° 35.



COURBE THERMOMÉTRIQUE N° 35 *bis*.

A) *Souris.* — Les essais ont été faits sur des souris blanches et grises. Un nombre très grand de souris a été inoculé avec le sang récolté chez les malades de fièvre boutonneuse, dans différents moments de la période fébrile. La quantité de sang inoculé variait entre 1 et 1,5 cc. La virulence du sang était prouvée. en même temps chez l'homme. Les souris, suivies assez longtemps



COURBE THERMOMÉTRIQUE n° 36.

(trente à quarante-cinq jours), n'ont présenté aucune manifestation morbide.

3 souris ont été sacrifiées douze jours après l'injection et, avec l'émulsion obtenue en mélangeant leurs rates, leurs foies et leurs cerveaux, nous avons inoculé 6 individus justiciables de pyrétothérapie. Les injections ont été faites dans le derme et sous la peau. Dans un seul cas, nous avons obtenu, après une incubation de sept jours, un résultat positif courbe n° 39), avec une éruption discrète. Le sang de ce malade, prélevé le septième jour de la période fébrile, s'est montré virulent pour un *Macacus cynomolgus,* avec une incubation de cinq jours (courbe n° 40).

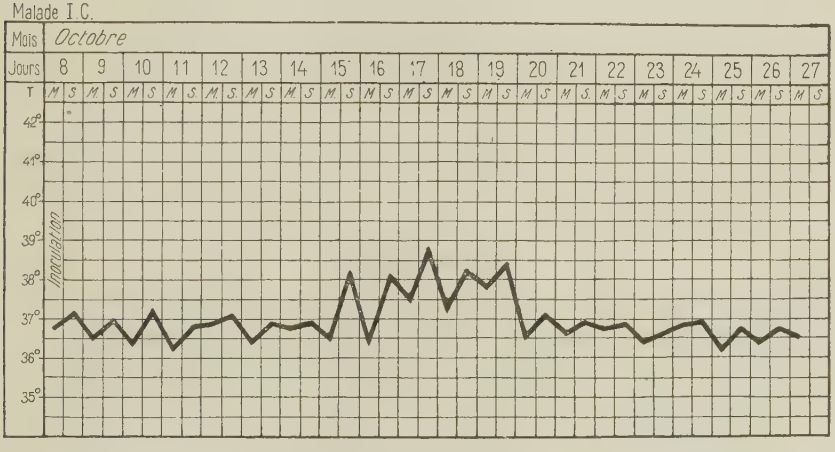
Ces expériences nous prouvent la réceptivité de la souris au virus de la fièvre boutonneuse, et confirment ainsi les résultats obtenus par Blanc et Caminopetros.

On comprendra très bien la difficulté qu'on a à vaincre quand il s'agit de faire de pareilles expériences. Il n'y a qu'un seul contrôle possible de l'infection des animaux de laboratoire : l'inoculation à l'homme. Et, de ce fait, les possibilités d'expériences sont limitées.

B) *Rat.* — P. Durand et J. Laigret ont montré que le virus de la fièvre boutonneuse peut infecter certains rongeurs (la

gerbille, le rat blanc) chez lesquels on doit admettre une infection inapparente réelle. En expérimentant sur le rat blanc inoculé avec du virus du sang de l'homme, nous avons constaté que ces animaux ne réagissaient pas, ne présentaient aucun signe d'infection. Les conditions d'expériences ne nous ont pas permis de voir si nous ne nous trouvons pas en présence d'une infection inapparente. Mais à côté des animaux qui ne réagissent pas, nous avons rencontré certains rats blancs qui ont présenté une réaction fébrile assez curieuse que nous trouvons intéressante à mentionner.

Nous présentons la courbe de température d'un rat inoculé,


Malade I.C.
Mois
Octobre
Jours
8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
T
M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S M S
42°
41°
40°
39°
38°
37°
36°
35°
Inoculation

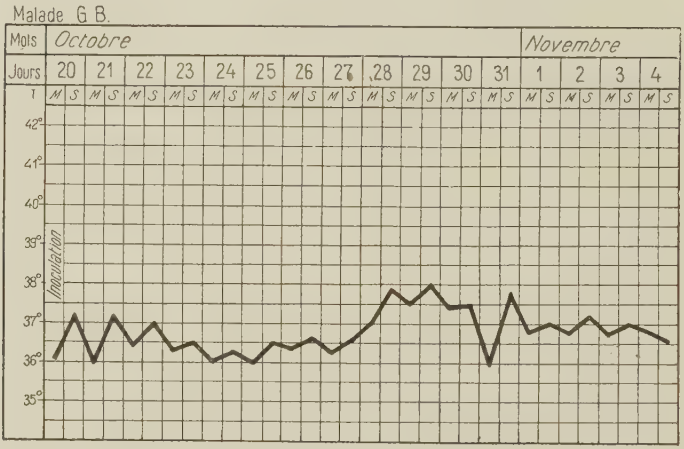
Courbe thermométrique n° 37.

sous la peau et dans le derme, avec 5 centimètres cubes de sang prélevé chez la malade A. S... Après dix jours d'incubation, le rat fait une ascension thermique allant jusqu'à 40° (courbe n° 41). Le cinquième jour de fièvre, le rat est sacrifié. Avec le broyage des organes du rat, nous inoculons un sujet qui fait une réaction douteuse.

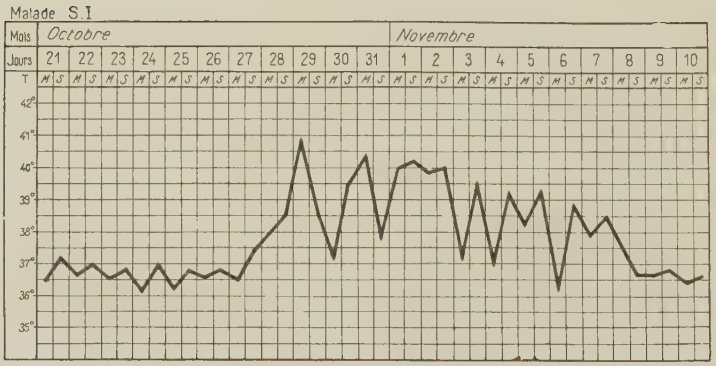
Nous considérons que ces expériences sont à reprendre.

c) *Cobaye.* — Nos expériences ont été faites sur un total de 15 cobayes. Ils ont été inoculés avec du sang virulent (1 à 6 centimètres cubes) soit dans le péritoine, soit sous la peau et dans le derme. 12 d'entre eux n'ont présenté aucune manifestation morbide, pas la moindre trace de fièvre. Mais les 3 autres cobayes

ont eu une réaction thermique assez nette. Un des cobayes avait reçu, dans le péritoine, 3 centimètres cubes du sang de trois malades (E. C..., N. M... et I. G. S...); les deux autres ont été ino-



Courbe thermométrique n° 38.



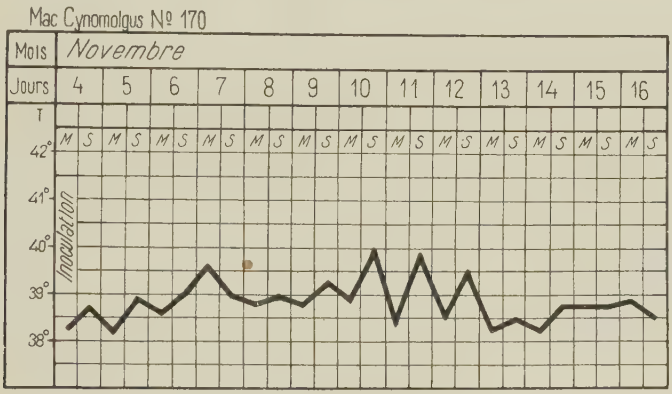
Courbe thermométrique n° 39.

culés sous la peau avec du broyage des organes de spermophile (Citillus citillus) infecté.

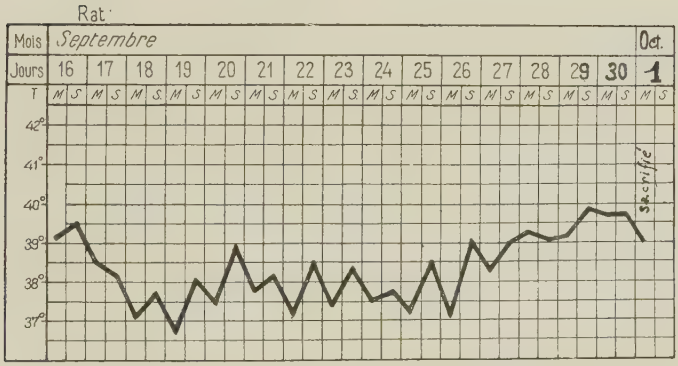
Nous donnons les courbes de température de ces derniers cobayes (courbes n^{os} 42 et 43), celle du premier cobaye reproduisant presque le même trajet que la courbe n° 42.

Nous n'avons pas eu la possibilité d'inoculer à l'homme le

sang ou le broyage des organes de ces cobayes, pour apporter la preuve évidente et décisive qu'il s'agissait bien d'une infection boutonneuse chez ces cobayes. Néanmoins, nous considérons ces expériences comme très intéressantes et qu'elles méritent d'être reprises.



COURBE THERMOMÉTRIQUE N° 40.

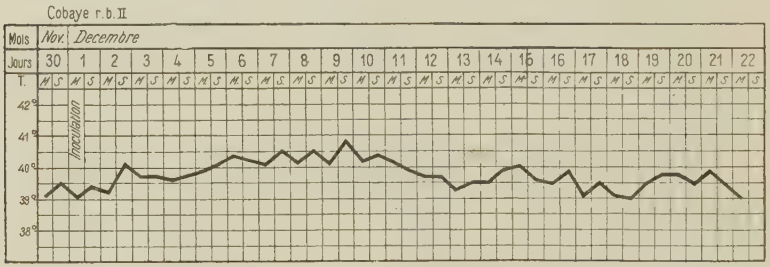


COURBE THERMOMÉTRIQUE N° 41.

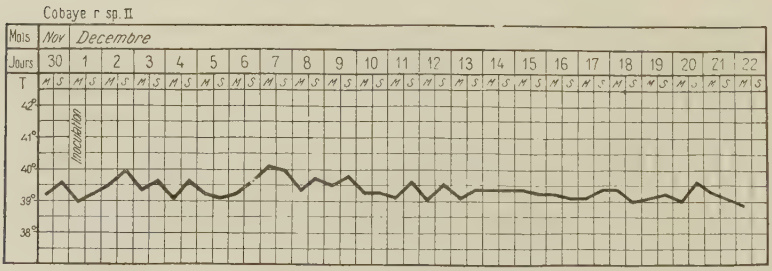
D) *Lapin.* — Les lapins inoculés avec du virus du sang de l'homme n'ont présenté aucun signe d'infection. Les animaux ont reçu, sous la peau ou dans le péritoine, 1 à 6 centimètres cubes de sang virulent. Nous n'avons pas eu la possibilité de rechercher si l'on peut reproduire une infection inapparente chez cet animal.

E) *Poule.* — Les expériences sur les poules ont donné des résultats négatifs.

F) *Spermophile* (Citillus citillus). — C'est à Blanc et Caminopetros que revient le mérite d'avoir montré la réceptivité du spermophile au virus de la fièvre boutonneuse. Nous avons réussi à confirmer ces expériences en obtenant la transmission de cette maladie à l'homme et au singe (Macacus Cynomolgus n° 174)



COURBE THERMOMÉTRIQUE n° 42.

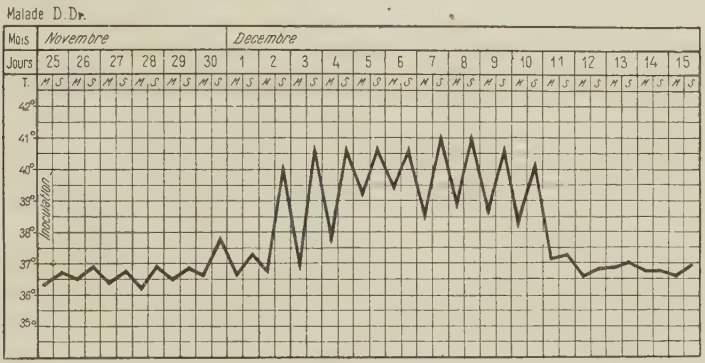


COURBE THERMOMÉTRIQUE n° 43.

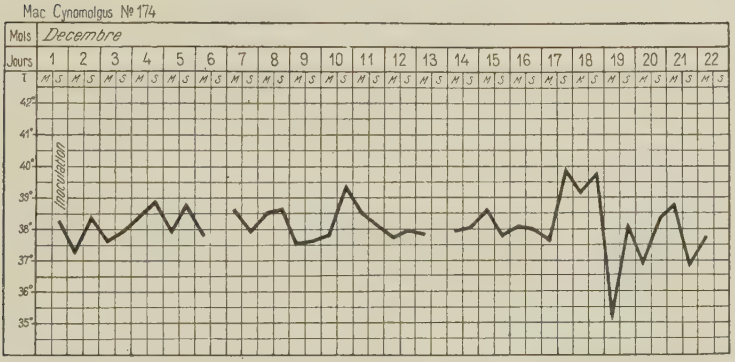
par l'émulsion préparée avec les viscères de cet animal (courbes n^{os} 44 et 45). Nous rappelons que c'est avec l'émulsion des organes de spermophile que nous avons obtenu une réaction thermique chez deux de nos cobayes.

G) *Chien.* — Nos recherches ont porté aussi sur deux chiens de Bucarest où, jusqu'à présent, on n'a pas rencontré la fièvre exanthématique. Le 9 octobre 1931, chaque chien reçoit, sous la peau, 10 centimètres cubes de sang récolté chez un malade en pleine période fébrile; ils ne présentent aucun signe de

maladie, la température reste toujours normale. Douze jours après cette première inoculation, ils reçoivent de nouveau, sous la peau, 16 centimètres cubes de sang virulent. Ce sang représente un mélange en parties égales du sang de 6 malades en pleine infection. Huit jours plus tard, les chiens ont été saignés,



COURBE THERMOMÉTRIQUE n° 44.



COURBE THERMOMÉTRIQUE n° 45.

leur sang citraté a été mélangé. Un singe (Macacus Rhesus n° 158) reçoit sous la peau 10 centimètres cubes de ce sang. Le cinquième jour, la fièvre apparaît pour arriver le septième jour à 41°. La température se maintient cinq jours (courbe n° 46), puis le Macacus se remet complètement. Le deuxième jour de fièvre à 41°, le singe est saigné. Le sang récolté est inoculé dans le derme et sous la peau d'un individu atteint de para-

lysie générale. Après une incubation de douze jours, ce sujet a fait une maladie fébrile durant quatre jours, la température variant entre 38° et 38°9 (courbe n° 47); l'éruption, quoique nette, a été représentée seulement par une dizaine de papules caractéristiques qui occupaient surtout la région thoracique. Tout ce temps, les chiens n'ont présenté aucun symptôme clinique d'infection. *Il faut donc admettre une infection inapparente réelle chez le chien.*

Récemment, P. Durand arrive aux mêmes conclusions : « Le virus boutonneux est donc capable d'évoluer chez le chien sous forme inapparente. » On pourrait expliquer les échecs expérimentaux antérieurs par le parasitisme si fréquent des chiens, par des Rhipicephalus sanguineus et par la fréquence du virus boutonneux chez cette tique, donc par une atteinte antérieure qui ait engendré une immunité assez forte. La découverte de cette sensibilité du chien est d'un très grand intérêt au point de vue épidémiologique. Elle nous montre que *le chien peut jouer, dans certaines circonstances, un rôle de réservoir pour la conservation du virus et la propagation de la maladie.*

VI. — Sixième série d'expériences.

Les expériences faites sur la filtrabilité du virus sanguin nous ont donné des résultats négatifs.

VII. — Septième série d'expériences.

Les recherches faites sur l'immunité dans la fièvre boutonneuse feront l'objet d'un autre mémoire.

EXAMENS DE LABORATOIRE

(*avec la collaboration de* S. Stamatesco, G. Eustatziu *et* G. Badenski).

Les examens de laboratoire ont été faits dans plusieurs directions :

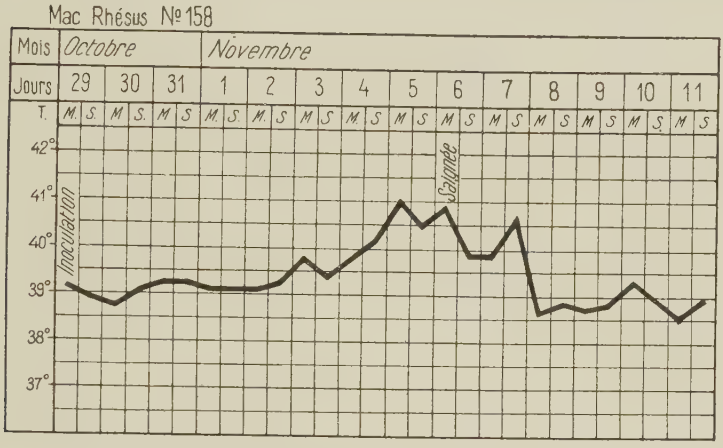
a) *La recherche de l'agent pathogène* par l'hémoculture sur différents milieux. Les résultats jusqu'à présent ont été négatifs.

b) *L'examen morphologique du liquide céphalo-rachidien.*

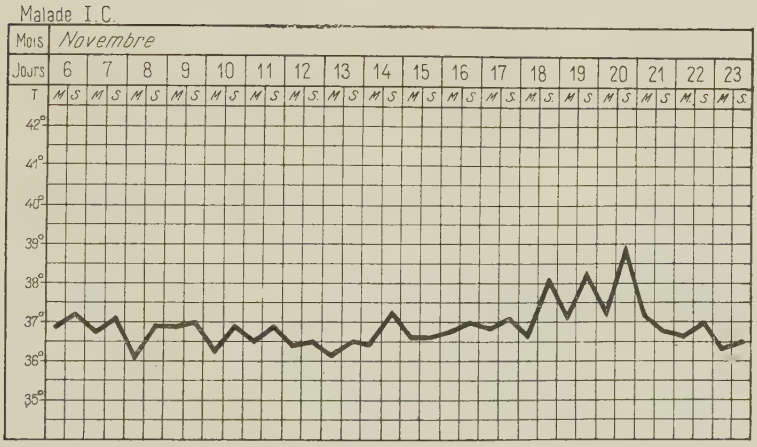
c) *Les recherches hématologiques.*

d) *La réaction de Weil-Félix.*

On sait que, dans le typhus exanthématique, *la formule cytologique du liquide céphalo-rachidien* est des plus typiques; elle est caractérisée par la présence, en grande quantité, de mono-



Courbe thermométrique n° 46.



Courbe thermométrique n° 47.

cytes à cytoplasma volumineux et métachromatiquement basophile. Ce tableau est suffisamment constant pour permettre de faire, dans des cas douteux, le diagnostic, même rétrospectif,

du typhus exanthématique. Or, dans l'épidémie de Constantza, du moins dans les cas examinés par nous, ce caractère cytologique était absent et le liquide céphalo-rachidien ne présentait rien de spécial à noter.

Les recherches hématologiques consistaient dans la numération globulaire et la formule leucocytaire.

Dans les tableaux suivants, nous donnons les résultats des numérations des hématies et des leucocytes faites systématiquement, pendant presque deux mois, chez 4 sujets infectés expérimentalement avec le virus boutonneux.

Malade G. M... — Inoculée le 13 septembre 1931. Apparition de l'éruption le 22 septembre.

Date de l'examen	Hématies par mmc.	Leucocytes par mmc.
12 septembre	5.176.000	11.900
14 —	4.508.000	20.000
16 —	5.172.000	8.500
18 —	5.200.000	9.000
20 —	4.891.000	8.000
21 —	4.025.000	7.800
22 —	3.653.000	7.400
24 —	4.612.000	8.400
26 —	4.132.000	9.800
28 —	4.332.000	10.000
30 —	4.232.000	10.000
2 octobre	3.880.000	8.900
4 —	4.353.000	8.900
6 —	4.033.000	8.700
8 —	4.440.000	6.600
10 —	4.086.000	9.480
12 —	4.571.000	10.000
14 —	5.000.000	9.600
18 —	4.590.000	9.600
5 novembre	5.000.000	10.000

Malade M. H. — Inoculée le 13 septembre. Réinoculée le 25 septembre. Apparition de l'éruption le 14 octobre.

Date de l'examen	Hématies par mmc.	Leucocytes par mmc.
12 septembre	4.580.000	7.200
14 —	4.547.000	13.000
16 —	4.320.000	7.830
18 —	4.560.000	6.380
20 —	4.939.000	6.000
21 —	4.373.000	6.000
22 —	4.153.000	5.600
24 —	4.327.000	5.400
26 —	4.665.000	10.466
28 —	4.128.000	7.300
30 —	4.116.000	8.332

Date de l'examen	Hématies par mmc.	Leucocytes par mmc.
2 octobre	4.372.000	8.440
4 —	4.124.000	7.132
6 —	4.212.000	6.500
11 —	4.240.000	8.000
13 —	4.444.000	6.682
15 —	3.928.000	6.342
17 —	4.142.000	5.700
19 —	»	4.500
21 —	4.720.000	9.300
23 —	4.760.000	9.400
25 —	4.560.000	11.800
27 —	4.539.000	11.400
29 —	4.417.000	11.000
31 —	»	13.200
6 novembre	4.924.000	11.000
9 —	5.172.000	19.000
10 —	6.000.000	17.900
16 —	»	12.200

Malade M. A. — Inoculée le 23 septembre 1931. Apparition de l'éruption le 5 octobre.

Date de l'examen	Hématies par mmc.	Leucocytes par mmc.
22 septembre	4.390.000	4.800
23 —	4.189.000	6.000
25 —	4.780.000	8.300
27 —	4.993.000	9.400
29 —	4.900.000	9.200
1er octobre	4.560.000	8.000
3 —	4.240.000	4.700
5 —	4.200.000	5.000
7 —	4.160.000	3.960
10 —	4.091.000	3.920
12 —	4.080.000	7.400
14 —	4.096.000	7.400
18 —	4.072.000	9.140
20 —	4.130.000	13.700
22 —	4.520.000	9.000
24 —	4.502.000	8.800
26 —	4.500.000	5.600
30 —	5.000.000	13.800
12 novembre	»	8.600
21 —	4.926.000	7.400

Malade M. D. — Inoculée le 25 septembre 1931. Apparition de l'éruption le 5 octobre.

Date de l'examen	Hématies par mmc.	Leucocytes par mmc.
25 septembre	4.000.000	9.400
26 —	3.964.000	11.732
27 —	4.242.000	8.000
29 —	4.305.000	6.500

Date de l'examen	Hématies par mmc.	Leucocytes par mmc.
1er octobre.....	4.105.000	9.400
3 —	4.440.000	4.426
5 —	4.160.000	5.132
7 —	4.145.000	3.700
10 —	3.542.000	5.774
12 —	4.160.000	6.500
14 —	3.824.000	6.000
18 —	4.308.000	5.824
21 —	4.515.000	7.500
22 —	4.332.000	7.400
24 —	4.211.000	7.800
26 —	4.193.000	6.600
28 —	4.411.000	11.200
30 —	4.908.000	5.200
5 novembre.....	»	9.200
11 —	4.400.000	9.800
13 —	4.400.000	15.200
15 —	»	12.600
21 —	4.500.000	12.600

Ces tableaux nous montrent que le nombre des hématies par millimètre cube n'est que très peu influencé au cours de la fièvre boutonneuse, ou les variations sont insignifiantes. Le début de l'éruption est accompagné d'une diminution du nombre des globules rouges, diminution assez passagère. *Au contraire, on constate une certaine variation dans le nombre des leucocytes. Chaque inoculation est suivie le lendemain d'une leucocytose qui va quelquefois jusqu'à doubler le nombre des globules blancs trouvés avant l'inoculation. Puis le nombre des leucocytes baisse pour arriver au moment du début de l'éruption à une leucopénie. Cette leucopénie précède de un à deux jours l'éruption et persiste encore trois, quatre ou cinq jours après l'apparition de l'exanthème. Puis une certaine leucocytose s'installe. Quelquefois, plus tard, dans la convalescence, on trouve une leucocytose assez prononcée.*

Quant à l'examen morphologique du sang, nous donnerons premièrement la formule leucocytaire trouvée chez les malades de Constantza. L'examen du sang n'a pu être effectué qu'une seule fois au cours de leur maladie. Nous indiquerons aussi la date du prélèvement du sang à examiner.

Puis nous présenterons les résultats des examens du sang des sujets avec la maladie expérimentale, chez lesquels cet examen a pu être poursuivi assez longtemps.

MALADES DE CONSTANTZA

	C. Gul... (10e jour de maladie)	*E. Car...* (18e jour de maladie)	*P. Pl...* (14e jour de maladie)	*M. P...* (11e jour de maladie)	*Ec. Tv...* (12e jour de maladie)
Poly. neutr.....	59	44	63,5	71,7	70
— éos.....	0,5	0,5	0,5	»	»
— bas.....	»	0,5	»	0,3	2
Lymph.	16	25	12,5	16	14
Monocytes	24,5	30	23,5	12	13
Cel. Türk.....	»	»	»	»	1

	K. L... (12e jour de maladie)	*P. Ptr...* (16e jour de maladie)	*S. Stoc...* (10e jour de maladie)	*A. G. F...* (10e jour de maladie)
Poly. neutr.....	54	45	39	75
— éos.....	1,5	0,5	1	»
— bas.....	»	»	2	»
Lymph.	18	20,5	18	14
Monocytes	26,5	34	40	11

FORMULE LEUCOCYTAIRE DANS LA MALADIE EXPÉRIMENTALE CHEZ L'HOMME

Malade G. M. — Inoculée le 12 septembre. Début de la fièvre le 20 septembre. Apparition de l'éruption le 23 septembre. Début de la convalescence le 3 octobre.

	12 sept.	16 sept.	18 sept.	20 sept.	24 sept.
Poly. neutr.....	62,5	59,5	61	60	74,5
— éos.....	12	7,5	5,5	5,5	»
— bas.....	»	»	»	»	0,5
Lymph.	12,5	14	20	20	16
Monocytes	13	19	13,5	14,5	9

	28 sept.	30 sept.	2 oct.	6 oct.	10 oct.	12 oct.
Poly. neutr.....	77	54	57,5	57	36,5	64,5
— éos.....	»	1	4	5,5	3	4,5
— bas.....	»	»	»	»	»	»
Lymph.	10	27,5	16,5	26	49	18
Monocytes	13	17,5	22	11	11,5	13
Cel. Türk.....	»	»	»	0,5	»	»

	14 oct.	18 oct.	19 oct.	22 oct.	27 oct.	5 nov,
Poly. neutr.....	67	37,5	53,5	43,5	53	62,5
— éos.....	2	7,5	10	7.5	7,5	5
— bas.....	1,5	1	»	1	»	0,5
Lymph.....	20,5	37,5	20	37,5	31,5	22
Monocytes.....	9	16,5	16,5	10	8	10
Cel. Türk.....	»	»	»	0,5	»	»

Malade M. A. — Inoculée le 23 septembre. Début de la fièvre le 29 septembre. Apparition de l'éruption le 5 octobre. Début de la convalescence le 10 octobre.

	21 sept.	23 sept.	25 sept.	27 sept.	29 sept.
Poly. neutr.....	72	73,5	75,5	75	67
— éos.....	3	2,5	2,5	2	3,5
— bas.....	»	»	»	»	»
Lymph.....	4	3	4	6	6,5
Monocytes.....	21	21	18	17	23

	1er oct.	3 oct.	5 oct.	12 oct.	14 oct.
Poly. neutr.....	74	79,5	69,5	75	56
— éos.....	1	0,5	3,5	2,5	2
— bas.....	»	»	»	0,5	0,5
Lymph.....	5,5	10	13,5	3	3
Monocytes.....	19,5	10	13,5	19	38,5

	18 oct.	20 oct.	22 oct.	24 oct.	26 oct.
Poly. neutr.....	58,5	58	43,5	46,5	62
— éos.....	1,5	3	2,5	2	2
— bas.....	0,5	1	2	2	1,5
Lymph.....	3	2,5	4	10	12
Monocytes.....	36,5	35,5	48	39,5	22,5

Malade E. A. — Inoculée le 3 septembre. Début de la fièvre le 7 septembre. Apparition de l'éruption le 10 septembre. Début de la convalescence le 21 septembre.

	12 sept.	14 sept.	16 sept.	18 sept.	20 sept.	21 sept.
Poly. neutr.....	78,5	81	74,5	75	73,5	80
— éos.....	»	»	»	»	1	1,5
— bas.....	0,5	»	»	»	»	0,5
Lymph.....	8,5	6,5	9	8,5	2,5	1,5
Monocytes.....	12,5	12,5	16,5	16,5	23	16,5

	22 sept.	27 sept.	4 oct.	7 oct.	9 oct.	24 oct.
Poly. neutr.....	66	58	82,5	75	75,5	74
— éos.....	1	1,5	0,5	»	1	1,5
— bas.....	»	1	»	»	»	»
Lymph.....	6	5	6	7,5	5	3
Monocytes.....	27	34,5	11	17,5	18	21,5

Les conclusions qui se dégagent de ces examens sont que, pendant la période fébrile, on rencontre dans la maladie boutonneuse une légère polynucléose et que, plus tôt ou plus tard, dans la convalescence, on constate un renversement de la formule leucocytaire : le nombre des éléments mononucléaires peut atteindre la proportion de 60 à 65 %.

Réaction de Weil-Félix. — P. Durand, dans son mémoire sur la réaction de Weil-Félix dans la fièvre boutonneuse, passe

en revue les publications faites sur cette question. Nous n'y reviendrons pas. Nous nous limiterons à donner les résultats de nos recherches personnelles.

Quand nous avons présenté notre première note préliminaire au Comité de l'Office international d'Hygiène, dans sa session d'octobre 1931, notre étude sur la fièvre boutonneuse était à peine commencée, du moins au point de vue expérimental. Nos constatations se rapportaient donc à la réaction de Weil-Félix faite avec le sérum des malades de Constantza. Le résultat des analyses faites dans le laboratoire de l'hôpital, pendant la période fébrile de la maladie, a été constamment négatif. Dans deux cas seulement, avec les sérums des convalescents, nous avons constaté un pouvoir agglutinant : 1 pour 1000 dans 1 cas, 1 pour 200 dans l'autre. La réaction de Weil-Félix, pratiquée avec le sérum des mêmes sujets pendant la période fébrile, a été négative. Comme nous n'avons pas pu apprendre si ces deux malades avaient été, ou non, atteints antérieurement de typhus exanthématique, nous avons considéré alors comme établi que la réaction de Weil-Félix n'existe pas dans la fièvre exanthématique de Marseille. Il aurait fallu ajouter, pour être exacts : « *pendant la période fébrile* ». Mais la constatation faite et relatée plus haut, que chez deux convalescents la réaction de Weil-Félix a été nettement positive et encore à un taux assez élevé, nous obligeait à reprendre ces recherches dans la maladie expérimentale. Les conditions étaient plus favorables, car nous pouvions suivre les malades plus longtemps et nous rendre compte si, en vérité, la réaction de Weil-Félix devient positive dans la convalescence. La chose nous semblait d'autant plus intéressante à reprendre que la réaction de Weil-Félix était apparue positive chez 2 individus chez lesquels la même réaction avait été négative quelque temps auparavant, pendant la période fébrile.

La réaction de Weil-Félix a été pratiquée vis-à-vis des antigènes : proteus HX^{19}, OX^{19} et HX^{2}.

Le tableau suivant (v. pp. 382-383) indique les malades observés, les dates du prélèvement du sang et les taux d'agglutination.

De la lecture de ce tableau, il résulte que la fièvre boutonneuse donne une réaction de Weil-Félix positive, et qu'à l'encontre de ce qui se passe dans le typhus exanthématique, dans la fièvre boutonneuse, la réaction de Weil-Félix est tardive.

A cette occasion, nous avons constaté un fait analogue à celui décrit par Félix, en 1919, dans le typhus de l'Asie Mineure; par Pijper, dans la fièvre typhoïde; par Pijper et H. Dan, dans la

TABLEAU D'AGGLU

Dilution des sérum

Malades	Date de l'examen	HX19					
		50	100	200	400	600	1
G. N...							
Inoculée le 12 sept.....	30 sept..	—	—	—	—	—	
Début fièvre, 20 sept.....	12 nov ..	++++	++++	++	+	+	
Début convalescence, 3 oct..	8 déc ...	++++	++++	++++	+++	++	
D. A...							
Inoculé le 25 sept.....	10 oct ...	—	—	—	—	—	
Début fièvre, 2 oct.....	12 nov ..	++++	+++	++	+	—	
Début convalescence, 12 oct..	8 déc ...	+++	+	—	—	—	
E. C...							
Inoculé le 7 oct.....	25 oct ...	—	—	—	—	—	
Début fièvre, 16 oct.....	12 nov ..	++++	++++	++++	+++	++	
Début convalescence, 28 oct..	8 déc...	+++	+	—	—	—	
E. T...							
Inoculé le 8 oct.....	25 oct ...	—	—	—	—	—	
Début fièvre, 16 oct.....	12 nov ..	++++	++++	+++	+	—	
Début convalescence, 30 oct..	8 déc ...	+	—	—	—	—	
D. F...							
Inoculé le 20 oct.....	30 oct ...	—	—	—	—	—	
Début fièvre, 25 oct.....	12 nov ..	++++	++++	++	+	+	
Début convalescence, 6 nov..	8 déc ...	++++	++++	+++	++	++	

« Tick-bite-fever » et dans le typhus sporadique de l'Afrique du Sud, chez l'homme et chez le cobaye. Il s'agit de la propriété qu'ont les sérums de gagner en pouvoir agglutinant par conservation. En vérité, dans la fièvre boutonneuse, la séro-réaction de Weil-Félix est plus intense et à un titre plus élevé quand le sérum a été gardé quelques jours à la température du laboratoire ou à la glacière. Le titre du sérum croît quelquefois du simple au double. Le phénomène semble inexplicable, mais il est d'une importance pratique très grande.

Nous en donnons quelques exemples.

Malade D. F..., saigné le 9 novembre; avec le même sérum, nous pratiquons la réaction de Weil-Félix les 10 et 12 novembre. Voici les résultats :

TION (R. Weil-Félix)

ICROBES AGGLUTINÉS

	OX19					HX2					
)	100	200	400	600	1000	50	100	200	400	600	1000
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
++	++++	+++	+++	++	+	++++	++++	+++	+++	++	+
++	+++	++	+	—	—	+++	+	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
+	+++	+	—	—	—	+++	+++	++	+	—	—
+	+++	+++	+	—	—	+++	+++	+	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
++	++++	+++	++	+	—	++++	++++	+++	+	—	—
+	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	++++	+++	+	—	—	—
	—	—	—	—	—	++++	++++	+++	+	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
++	+++	++	—	—	—	++++	+++	++	—	—	—
++	++++	+++	++	+	—	+++	++	+	—	—	—

Réactions faites le 10 novembre :

HX19				OX19			
50	100	200	400	50	100	200	400
++	+	—	—	+	+	—	—

Réactions faites le 12 novembre :

HX19				OX19			
50	100	200	400	50	100	200	400
++++	++++	++	+	++++	+++	++	—

HX2			
50	100	200	400
++	++	—	—
++++	+++	++	—

Malade D. A., dans les mêmes conditions :

Réactions faites le 10 novembre :

HX¹⁹				OX¹⁹			
50	100	200	400	50	100	200	400
++	+	—	—	++	+	—	—

Réactions faites le 12 novembre :

HX²				OX¹⁹			
50	100	200	400	50	100	200	400
++++	+++	++	+	+++	+++	+	—

HX²			
50	100	200	400
++ ++++	+ +++	— ++	— +

EXAMENS HISTO-PATHOLOGIQUES DES LÉSIONS CUTANÉES

(*avec la collaboration de* Cornelia Combiesco).

Nos descriptions sont basées sur l'étude de la peau incisée sur le bras de deux sujets. Le matériel à étudier a été prélevé le huitième et le onzième jour de la maladie et, approximativement, le cinquième et le huitième jour de l'éruption.

Les coupes ont été colorées par la méthode de Giemsa, après la fixation dans le liquide de Dubosc-Brasil.

Les lésions trouvées sont du même type. L'épiderme est d'aspect normal. Les modifications les plus importantes se trouvent au niveau des vaisseaux du derme et sont représentées par des groupes circonscrits de cellules autour des vaisseaux, constituant des nodules. Nous n'avons jamais trouvé de thrombus, de même que nous n'avons jamais rencontré de formations qui auraient pu être considérées comme des Rickettsias. A part les nodules, nous rencontrons dans le derme des infiltrations diffuses autour des capillaires. Quelquefois l'endothélium vasculaire est tuméfié et les capillaires sont tellement remplis de cellules endothéliales qu'à peine on peut distinguer la paroi vasculaire. La

plus grande partie des cellules des nodules périvasculaires sont caractérisées par un protoplasma pâle, peu coloré, par un noyau avec le réseau chromatique très laxe. Ce sont des monocytes, des cellules du système réticulo-endothélial. On y trouve encore quelques lymphocytes, quelques cellules plasmatiques et d'assez nombreux mastocytes (Mastzellen). Quelquefois, nous rencontrons beaucoup de leucocytes polynucléaires neutrophiles, attirés là, probablement non par une infection secondaire, mais plutôt par les cellules nodulaires dégénérées à la suite d'une accumulation trop abondante de cellules réactionnelles et donc d'une insuffisance de nutrition (planche n° 1).

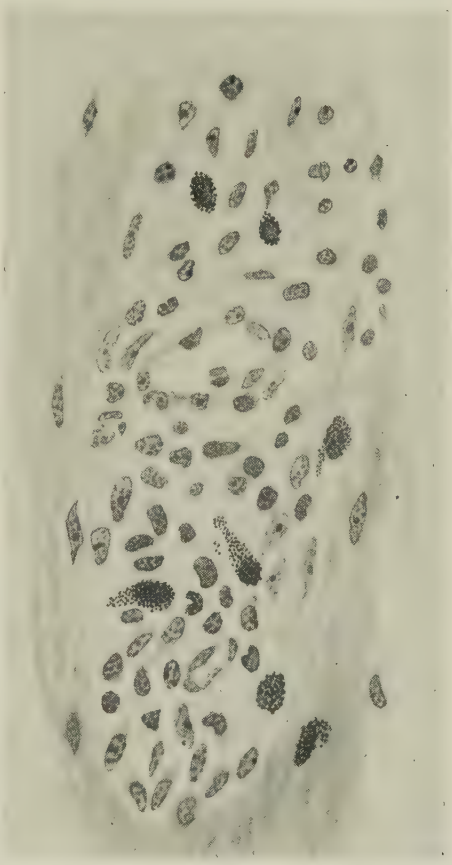


PLANCHE I

SOMMAIRE ET CONCLUSIONS

L'étude clinique et expérimentale de la maladie qui sévit à Constantza (Roumanie), pendant l'été de 1931, montre qu'il s'agit là d'une maladie identique à la fièvre exanthématique de Marseille décrite par D. Olmer, en 1925, et que Conseil a identifiée, « sans l'ombre d'un doute », avec la fièvre boutonneuse de A. Conor et A. Bruch (1910). La symptomatologie décrite par Olmer chez les malades observés à Marseille est la même que celle rencontrée dans les cas de Conor et Bruch, ou chez une partie des malades de Carducci, Césari, Filippella, Cavalleti, Pecori, etc., à Rome, ou dans les cas de Ricardo George, à Lisbonne, ou chez les malades soignés à Constantza.

Olmer insiste sur les caractères suivants : exanthème sous forme de poussées; l'exanthème n'épargne pas la face, énanthème pharyngien conjonctival quelquefois, absence de stupeur, présence de taches, de boutons ou escarres accompagnés d'adénites, absence de contagion, absence de foyers endémiques, caractère saisonnier, sévissant l'été et au commencement de l'automne, absence des poux, — caractères que nous avons rencontrés aussi dans la maladie de Constantza.

La tique Rhipicephalus sanguineus récoltée chez les chiens de Constantza, et inoculée à l'homme, reproduit la fièvre boutonneuse. Les tiques adultes et les nymphes ont été trouvées infectantes même si elles ont été gardées plusieurs mois dans le laboratoire.

Comme Blanc et Caminopetros, nous avons pu démontrer que cette infection est héréditaire chez la tique.

L'infection par la voie conjonctivale est possible.

On peut transmettre la maladie de l'homme à l'homme par l'inoculation de sang virulent, mais la conservation du virus chez l'homme par passage est assez difficile, sinon impossible.

On peut obtenir l'infection de l'homme soit par l'injection sous la peau, soit par injection dans le derme ou dans les veines.

Les expériences pratiquées chez l'homme nous montrent une différence individuelle de réaction.

Les résultats sont positifs en inoculant du sang total, du plasma ou le dépôt globulaire obtenu par centrifugation.

Nous avons obtenu des résultats intéressants avec le mélange de virus, avec un virus polyvalent : la croissance du pouvoir pathogène de ce virus.

Nous avons réalisé des résultats positifs de passage de l'homme à l'homme, de l'homme au singe, du singe à l'homme.

Nous considérons la tache noire, dans la fièvre boutonneuse ou fièvre exanthématique de Marseille, comme un chancre d'inoculation de cette infection.

Les expériences faites chez les animaux de laboratoire nous montrent :

a) La souris peut être infectée.

b) Les résultats que nous avons eu chez le rat blanc et le cobaye ne nous autorisent pas à une conclusion définitive. Durand et Laignet ont décrit une infection inapparente réelle chez le rat. Nos expériences semblent nous indiquer qu'il est possible de rencontrer quelquefois une infection apparente chez le rat et peut-être chez le cobaye. Ce sont des expériences à reprendre.

c) Le lapin semble irréceptif à l'infection boutonneuse.

d) Le chien est réceptif, il fait une maladie inapparente.

Les examens de laboratoire nous ont donné des résultats négatifs pour la recherche directe de l'agent pathogène de la fièvre boutonneuse.

L'examen morpholgique du liquide céphalo-rachidien ne présente rien de spécial.

L'examen du sang montre que le nombre des hématies est très peu influencé au cours de la fièvre boutonneuse ; le début de l'éruption est accompagné d'une diminution du nombre des globules rouges, diminution passagère. On constate une certaine variation dans le nombre des leucocytes : leucopénie au commencement de l'éruption, puis une certaine leucocytose, leucocytose accentuée quelquefois dans la convalescence. Dans la période fébrile, on a une légère polynucléose neutrophile; mais dans la convalescence, on trouve un renversement de la forme leucocytaire, le nombre des leucocytes mononucléaires atteignant la proportion de 60 à 65 %.

En ce qui concerne la réaction de Weil-Félix, la fièvre boutonneuse donne une réaction positive tardive, — confirmation des opinions de Olmer, Burnet et surtout de Durand.

Le pouvoir agglutinant du sérum augmente par conservation.

L'étude histologique des éléments éruptifs montre les modifications les plus importantes tout autour des vaisseaux, avec la formation des nodules caractéristiques, dans la constitution desquels entrent, en premier lieu, les cellules réticulo-endothéliales (histiocytes), quelques lymphocytes, d'assez nombreux mastocytes et quelquefois des polynucléaires neutrophiles.

BIBLIOGRAPHIE

1. Barzanescu (G.) et Vasiliu (V.) : *Revista Stiinţelor Medicale,* XX, 1931, p. 1064.
2. Beros et Balozet : *Bull. Soc. Path. exot.,* XXII, 1929, p. 712.
3. Blanc (G.) et Caminopetros (J.) : *Bull. Acad. Méd.,* 14 avril 1931.
4. Id. : *Acad. Sciences,* CXCII, 1931, pp. 1504 et 1682.
5. Id. : *Ibid.,* CXCIII, 1931, pp. 258 et 374.
6. Id. : *Arch. Inst. Pasteur Tunis,* XX, 1932.
7. Brumpt (E.) : *C. R. Acad. Sciences,* CXCI, 1930, p. 889.
8. Burnet (Et.) et Olmer (D.) : *Arch. Inst. Pasteur Tunis,* XVI, 1927, p. 317.
9. Id. : *C. R. Acad. Sciences,* CLXXXVII, 1928, p. 470.
10. Burnet (Et), Olmer (D.) et Durand (P.) : *C. R. Acad. Sciences,* CLXXXVII, 1928, pp. 1071 et 1084.
11. Chabal (L.) : *Bull. Soc. Path. exot.,* XXIV, 1931, p. 76.

12. Claude (H.) et Coste (F.) : *Bull. et Mém. Soc. méd. Hôp.* Paris, XLVII, 1931, p. 168.
13. Combiesco (D.) : *Bull. off. int. Hygiène publ.*, XXIII, 1931, p. 1979.
14. Combiesco (D.) et Zotta (G.) : *C. R. Soc. Biologie*, CVIII, 1931, p. 1279.
15. Combiesco (D.) : *C. R. Soc. Biologie*, CVIII, 1931, p. 1281.
16. Id. : *Ibid.*, CVIII, 1931, p. 1282.
17. Id. : *Ibid.*, CIX, 1932, p. 793.
18. Combiesco (D.) et Zotta (G.) : *C. R. Soc. Biologie*, CX, 1932, p. 1222.
19. Id. : *Ibid.*, CX, 1932, p. 1223.
20. Conor (A.) et Bruch (A.) : *Bull. Soc. Path. exot.*, III, 1910, p. 492.
21. Conseil (E.) : *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, fasc. 1, 1929.
22. Id. : *Ibid.*, XIX, 1930, p. 376.
23. Durand (P.) et Conseil (E.) : *C. R. Acad. Sciences*, CXC, 1931, p. 1244.
24. Durand (P.) : *C. R. Acad. Sciences*, CXCII, 1931, p. 857.
25. Id. : *Ibid.*, CXCIV, 1932, p. 918.
26. Durand (P.) et Laignet (J.) : *C. R. Acad. Sciences*, CXCIV, 1932, p. 798.
27. Id. : *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, XX, 1932, pp. 422 et 426.
28. Durand (P.) : *C. R. Acad. Sciences*, CXCI, 1932, p. 569.
29. Id. : *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, XX, 1932, p. 395.
30. Ionesco-Mihaiesti (C.), Tupa (A.), Wisner (B.) et Mesrobeanu (I.) : *C. R. Soc. Biol.* CIII, 1930, p. 173.
31. Isacesco (M.) et Olinesco (R.) : *Revista Stiintelor Medicale*, XX, 1931, p. 1087.
32. Jorge (Ricardo) : *Bull. off. int. Hygiène publ.*, XXII, 1930, p. 909.
33. Joyeux (C.) et Pieri (J.) : *C. R. Acad. Sciences*, CXCII, 1931, p. 705.
34. Lemaire (G.) : *Presse médicale*, n° 105, 1930, p. 1801.
35. Lutrario (A.) : *Bull. off. int. Hygiène publ.*, XXIII, 1931, p. 676.
36. Marçon (H.) et (L.) : *Bull. Soc. Path. exot.*, XXIII, 1930, p. 889.
37. Megaw (J.-W.) : *Bull. off. int. Hygiène publ.*, XXII, 1930, p. 1527.
38. Mazet (G.) : *Gazette des Hôpitaux*, 24 janv. 1931.
39. Olinesco (R.) : *Revista Stiintelor Medicale*, XX, 1931, p. 1348.
40. Olmer (D.) : *Marseille médical*, 5 août 1925, p. 1291.
41. Id. : *Bull. off. int. Hygiène publ.*, XXII, 1930, p. 1494.
42. Olmer (D.) et Olmer (J.) : *Bull. et Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, XLVII, 1931, p. 167.
43. Id. : *Bull. Acad. Méd.*, 1931, CVI, p. 348.
44. Piéri (J.) et Brugéas : *Marseille médical*, 5 novembre 1925, p. 1736.
45. Pijper (A.) et Dan (H.) : *Brit. Journ. exper., Path.*, XI, 1930, p. 287.
46. Id. : *Ibid.*, XXII, 1931, p. 123.
47. Scott (H.) : *Bull. off. intern. Hygiène publ.*, XXII, 1930, p. 1522.
48. Toullec : *Bull. Soc. Path. exot.*, XXIII, 1930, p. 152.
49. Wolff (J.-W.) : *Journ. of Hygiene*, XXXI, 1931, p. 352.

SUR QUELQUES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES HÉMATIES HUMAINES L'HÉMATIE MURIFORME

par

Alfred TEITEL BERNARD

(Travail de la 3e Clinique médicale
[Directeur : Professeur Docteur C. Bacaloglu]
et du Laboratoire de Médecine expérimentale
[Professeur Docteur I. Cantacuzène])

Les propriétés particulières physiques et physico-chimiques des hématies, examinées dans la chambre humide du micromanipulateur de Péterfi, ont été étudiées et décrites par W. Seifriz [1], F. Weidenreich [2] et H. Simmel [3]. Dans les notes qui suivent, nous allons étudier la réversibilité, en certaines conditions, de l'état mûriforme des hématies, une particularité physico-chimique déjà signalée par Weidenreich [2].

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Nous avons employé, pour ces recherches, des hématies fraîches obtenues par piqûre de la pulpe du doigt, ainsi que des hématies provenant d'un sang veineux défibriné, prélevé le jour même ou vingt-quatre heures auparavant. On dépose une goutte minuscule de sang ou de suspension globulaire sur la lamelle de la chambre humide de Péterfi, sur un fragment de papier de soie humecté de sérum physiologique. On dissocie ensuite à l'aide d'aiguilles le papier de soie, de façon à ce que les fibres de cellulose délimitent des espaces irréguliers, plus ou moins grands, occupés par la suspension globulaire. On emploie de petites quantités de sérum et de globules, de sorte que les couches de liquide qui se trouvent étalées entre les fibres de cellulose soient très

minces et forment de vrais « films », des couches capillaires limitées par la surface de la lamelle et par la membrane de tension superficielle du sérum. Pour empêcher l'évaporation, la chambre humide est doublée d'un papier filtre imbibé d'eau physiologique. On y ménage un orifice pour le passage des rayons lumineux venant du condensateur. De même, un fragment de papier filtre, pourvu d'une ouverture convenable, est humecté d'eau physiologique et appliqué sur la lamelle, de façon à entourer à quelques millimètres de distance la goutte de sang étalée. La lamelle ainsi préparée est retournée et appliquée sur la chambre humide dont les bords sont enduits de vaseline. Nous avons employé, comme instruments de micromanipulation, des pointes très fines en verre Pyrex. Les dimensions de ces pointes ont varié d'un demi à deux microns. Lorsqu'on examine la préparation à un grossissement de 400 à 900 diamètres, on trouve beaucoup de zones inutilisables

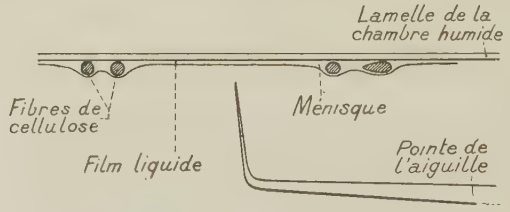


Fig. 1. — Schéma d'une zone utilisable à film liquide mince.

où les fibres de cellulose incomplètement dissociées forment des masses opaques. On y trouve cependant aussi des zones favorables aux observations micrurgicales. Ce sont des espaces plus grands, délimités par des fibres cellulosiques et occupés par un film bien mince de liquide. Au voisinage immédiat des fibres de cellulose, la couche de liquide est plus épaisse et forme un ménisque à concavité inférieure.

Les hématies sont inégalement distribuées dans le film liquide. A proximité des fibres cellulosiques, elles se trouvent en plus grand nombre, flottant librement dans le liquide de suspension. Dans les zones où la couche de liquide est très mince, elles sont immobiles et, souvent groupées en petits amas. Leur aspect diffère aussi. Dans les zones riches en liquide, on trouve des hématies d'aspect régulier, discoïdes, sans dépression centrale. Groupées en petits amas, elles peuvent se déformer réciproquement et prendre l'apparence de dalles. Elles ont l'aspect des hématies des frottis de sang. Toutefois, elles sont mobiles et peuvent être déplacées dans

le liquide qui les entoure. Ces hématies paraissent aplaties à la

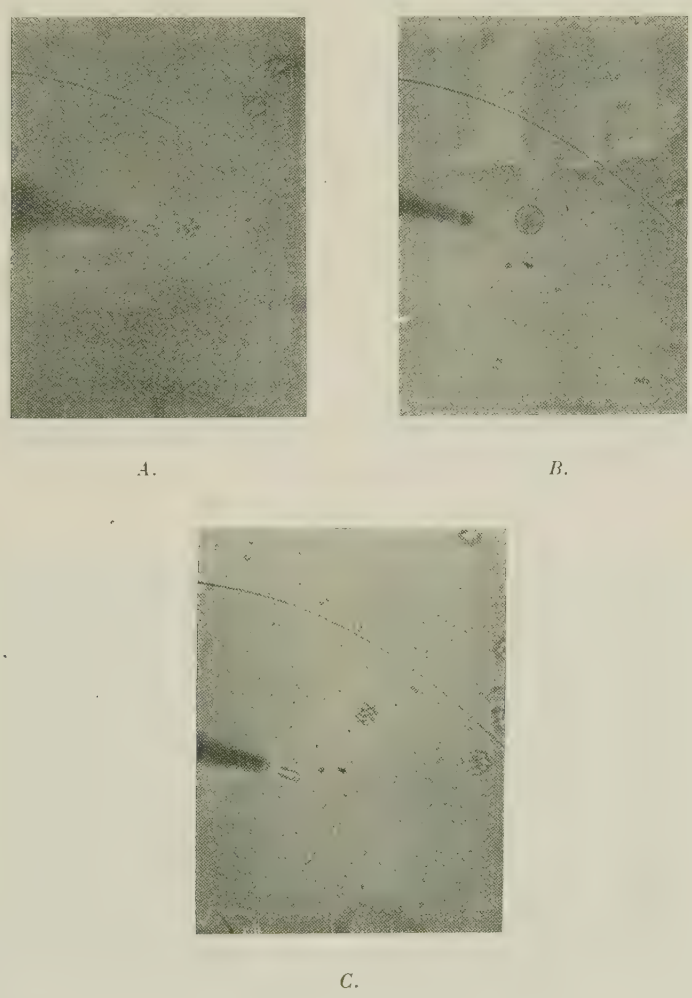


Fig. 2. — Trois aspects successifs d'une même hématie. On aperçoit l'aiguille à gauche.

A. La pointe de l'aiguille touche le liquide près de l'hématie.
B. La pointe abaissée a quitté le film liquide.
C. La pointe touche de nouveau le film.

surface de la lamelle par la membrane élastique de tension superficielle du liquide.

Lorsque la pointe de l'aiguille du micromanipulateur touche la surface du film, il se produit un déplacement du liquide étalé. Des courants de liquide convergent vers la pointe et forment un ménisque autour. Les hématies qui se trouvent à proximité sont souvent entraînées par ces courants. Elles se groupent parfois autour de la pointe en formant de vraies rosettes. En même temps, certaines hématies rapprochées de la pointe de l'aiguille, entraînées ou non par les courants de liquide, perdent leur contour régulier, deviennent crénelées ou mûriformes et leur diamètre apparent diminue. Elles souffrent un plissement de leur surface, un ratatinement. Ces modifications se produisent d'une manière brusque au moment où la pointe touche le liquide. Quand on éloigne l'aiguille, au moment où son extrémité quitte la couche de sérum, les phénomènes inverses se produisent. Un courant liquide centrifuge déplace les hématies. Celles-ci perdent l'aspect mûriforme, deviennent à nouveau discoïdes, à contour circulaire régulier. L'état mûriforme est transitoire et parfaitement réversible; il peut être reproduit un grand nombre de fois.

Il ne paraît point que ce soit le contact de la pointe de verre avec le film liquide qui déclenche la transformation des hématies discoïdes en hématies mûriformes. Si nous établissons le contact de la pointe et du liquide à une distance appréciable des hématies, puis nous la rapprochons par un mouvement latéral, le phénomène se répète, identique. Les hématies se plissent, deviennent mûriformes lorsque l'aiguille s'approche ; elles redeviennent lisses et régulièrement discoïdes lorsqu'elle s'éloigne, sans quitter le liquide. Lorsqu'on approche lentement la pointe de verre, la transformation mûriforme est elle-même lente et l'on peut surprendre les phases intermédiaires d'hématies crénelées, puis l'apparition des pointes coniques qui caractérisent l'état mûriforme.

Toutes les hématies discoïdes ne deviennent pas crénelées et mûriformes à l'approche de la pointe de verre. Un certain nombre garde l'aspect régulier normal; d'autres esquissent quelques crénelures. Les hématies discoïdes gardent inaltérée la plasticité parfaite et l'élasticité si caractéristique du globule normal. Les hématies mûriformes, par contre, donnent une impression nette de rigidité, paraissent comme figées. Ces caractéristiques de consistance sont communes aux hématies mûriformes préexistantes et à celles provoquées par l'approche de la pointe de verre. Quand l'aiguille s'approche d'un groupe de globules, la transformation mûriforme se produit même pour les hématies situées à quelques

dizaines de microns de la pointe de l'instrument. Les hématies les plus rapprochées de l'aiguille souffrent une transformation des

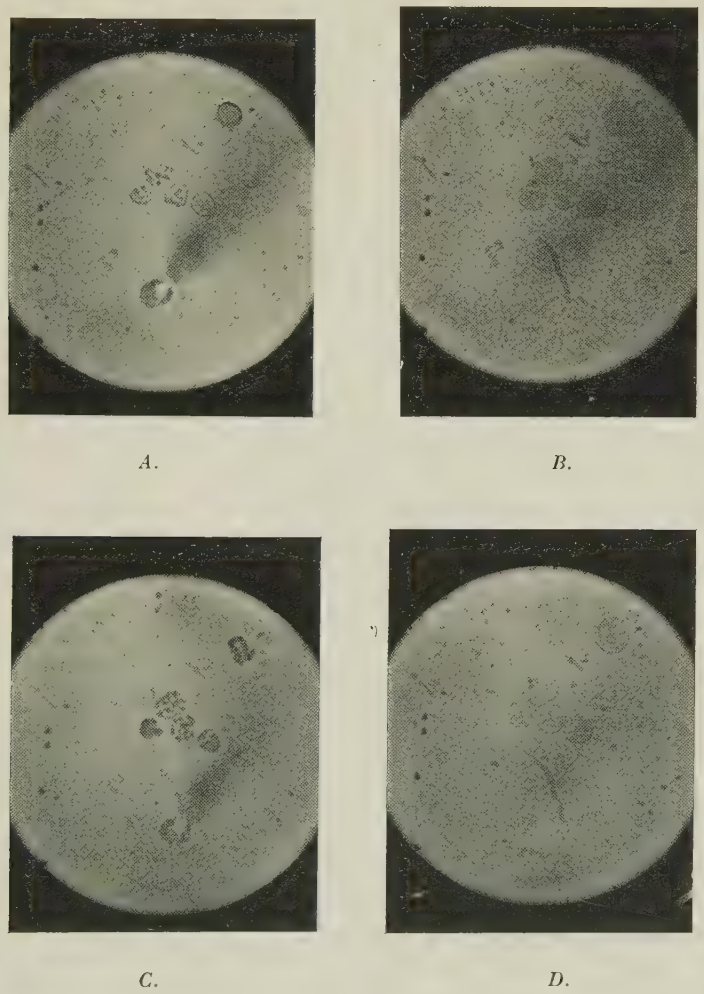


Fig. 3. — Quatre aspects successifs d'un groupe d'hématies.
A. et *C.* La pointe de l'aiguille touchant le film liquide en bas.
B. et *D.* La pointe étant éloignée. On aperçoit l'ombre de l'aiguille.

plus accentuée, prennent l'aspect mùriforme typique; celles plus éloignées deviennent simplement crénelées.

Parfois seule, la partie de l'hématie qui est plus proche de l'aiguille présente des pointes coniques, le reste paraît normal.

Deux états mûriformes successifs de la même hématie sont identiques comme aspect, comme nombre et comme dimensions des pointes, si l'aiguille en est rapprochée chaque fois à la même distance. Séparées par un stade d'hématie normal discoïde, plastique et déformable, mais élastique, elles reproduisent le même globule mûriforme. Il paraît ainsi que le nombre et la distribution des pointes caractéristiques de l'état mûriforme, si variables de globule à globule, sont, pour une même hématie, prédéterminés d'une certaine manière. Leur apparition paraît être en relation avec des particularités physico-chimiques intraglobulaires individuelles, relativement invariables.

Au voisinage des fibres de cellulose, les phénomènes présentés par les hématies sont différents. Le plus grand nombre des globules discoïdes d'aspect normal ne subissent aucune modification du fait de l'approche de la pointe de verre. De même les hématies mûriformes préexistantes. De rares hématies discoïdes, plus éloignées des fibres de cellulose, deviennent pourtant crénelées, puis mûriformes à l'approche de l'aiguille. Une hématie crénelée préexistante, qui se trouve au voisinage des fibres de cellulose, dans la zone riche en liquide, peut être déplacée et attirée à l'aide de l'aiguille dans une zone qui ne possède qu'un mince film de sérum. Cette hématie, bien qu'au voisinage immédiat ou même au contact de la pointe de verre, perd son aspect mûriforme. Elle devient discoïde, aplatie, régulièrement circulaire. Cet aspect se produit lorsque le film liquide est bien mince et le ménisque provoqué par l'aiguille, fort pauvre en liquide. L'hématie perd sa rigidité, paraît se fluidifier d'une manière assez brusque. Elle semble être aplatie par la membrane de tension superficielle. Ramenée dans les régions riches en liquide, elle redevient mûriforme.

Les phénomènes que nous venons de décrire se produisent en des conditions variées. Nous les avons obtenus avec du sang frais dilué au sérum physiologique; avec du sang défibriné, gardé un jour ou deux à la glacière; avec des hématies suspendues dans du sérum sanguin humain, puis dissociées sur du papier de soie imbibé du même sérum, sans faire intervenir donc des solutions salines; avec des hématies lavées au sérum physiologique, et enfin avec des hématies lavées 8 fois à la centrifuge avec une solution isotonique de glucose pure pour en éliminer les électro-

lytes. Il paraissent ainsi, d'une certaine façon, indépendants du milieu colloïde ou salin extra-globulaire et dus à des modifications physico-chimiques intrahématiques.

DISCUSSION DES FAITS

L'état mûriforme a longtemps été considéré comme étant dû au ratatinement des hématies, au plissement de leur membrane à la suite d'une perte d'eau du contenu globulaire. Cette perte d'eau était expliquée par une augmentation de la concentration du milieu extraglobulaire. Cet artéfact avait été observé en des conditions très différentes. Le déterminisme exact n'en a pas encore été précisé. L'explication courante paraissait satisfaisante et l'épithète d'artéfact a justifié le manque d'intérêt manifesté pour ces formes de globule rouge. Le problème est pourtant assez complexe. Si l'on schématise la forme de l'hématie et si on la considère comme étant sphérique, la simple diminution de volume par perte d'eau ne nous donne pas une explication suffisante de l'aspect mûriforme, même si l'on admet l'existence d'une membrane préformée plus ou moins rigide. Une sphère qui présente une telle membrane se déprime en un point lorsque son contenu diminue. Il suffit de se rappeler l'aspect d'une balle qui a perdu, en même temps que son élasticité, une partie de l'air qui y était renfermé. Pour un disque biconcave, forme normale de l'hématie, les modifications que peut provoquer la perte d'eau sont bien déterminées. Si nous admettons que les hématies possèdent une membrane plus ou moins élastique et un contenu fluide, elles doivent s'amincir, s'aplatir lorsqu'elles perdent de l'eau par exosmose, et leur diamètre apparent doit augmenter légèrement. Leur surface ne serait sollicitée en ce cas par aucune force qui en modifierait l'aspect. Pour vérifier cette hypothèse un peu simpliste de la structure des hématies, nous avons fait une série de déterminations de leur épaisseur moyenne dans des liquides salins de tonicité variée. Nous avons utilisé, à cette fin, la tendance qu'ont les hématies à se grouper sous forme de « piles de monnaie » si caractéristiques. Nous avons mesuré la longueur d'un nombre de pareilles piles, nous avons additionné les dimensions trouvées et nous avons divisé le total par le nombre des hématies qui formaient ces piles. Nous avons déterminé ainsi, sur un nombre d'une centaine de globules environ, une moyenne de l'épaisseur d'un globule dans une pile. La valeur ainsi calculée est différente

de l'épaisseur moyenne exacte d'une hématie isolée. Les forces d'attraction interglobulaires, la plasticité des hématies, leur résistance élastique aux déformations, l'épaisseur de la couche liquide interposée, ainsi que leur turgescence, interviennent comme autant de variables. Les valeurs comparatives obtenues sont pourtant suffisantes pour le but que nous poursuivons. Nous avons trouvé ainsi une épaisseur moyenne de 2,3 μ pour les hématies d'un sang défibriné, mesurées en suspension dans leur propre sérum sanguin. Dans le même sérum rendu légèrement hypotonique par de l'eau distillée, les piles de globules diminuent de diamètre et s'allongent pour le même nombre d'hématies. En ces conditions, nous avons trouvé des moyennes de 2,8 μ à 3 μ pour l'épaisseur d'une hématie. Nous avons ajouté ensuite, au sang défibriné, du chlorure de sodium pour rendre le milieu hypertonique. Beaucoup d'hématies sont devenues mûriformes et se trouvent isolées, ne manifestant aucune tendance à se grouper en piles. Toutefois, un nombre d'hématies ont gardé l'aspect discoïde et forment des piles plus ou moins longues. L'épaisseur moyenne des hématies y est de 1,6 μ à 1,8 μ, selon la tonicité du sérum. Elles paraissent lamellaires, aplaties et présentent parfois un contour légèrement crénelé. La perte d'eau, la diminution du contenu globulaire n'est donc point obligatoirement suivie par la transformation mûriforme. Waller [4] arrive d'ailleurs à la même conclusion. L'aspect mûriforme est certainement dû à la mise en jeu d'autres mécanismes qui accompagnent ou sont accompagnés de la perte d'eau endoglobulaire.

Une hématie dont l'état mûriforme est provoqué par un sérum hypertonique doit avoir un volume moindre, mais une surface plus grande qu'une hématie normale. Les pointes des reliefs qui caractérisent l'état mûriforme paraissent correspondre à certaines formations plus rigides de l'intérieur des hématies. Bürker [5] les considère comme des portions du squelette, du stroma globulaire, qui ne se sont pas ratatinées dans la même mesure que le reste de l'hématie. Les hématies sphéro-épineuses à pointes très fines, qui apparaissent dans les mêmes conditions que les hématies mûriformes, rendent encore moins vraisemblable l'explication du ratatinement globulaire. La base même de cette explication est mise en doute par Ponder [6] qui démontre que les hématies du lapin diminuent légèrement de volume lorsqu'elles sont suspendues dans des solutions hypertoniques, mais qu'elles gonflent ensuite et peuvent même dépasser le volume initial. Il a observé de même l'apparition d'hématies mûriformes,

sans modifications de volume ou même accompagnées par un gonflement des globules. Il signale le fait que l'on peut trouver des hématies mûriformes dans des solutions de chlorure de sodium hypotoniques, à 3 ‰ par exemple. De plus, l'apparition des hématies mûriformes n'étaient pas constante dans ses expériences parallèles, et des conditions non précisées paraissent jouer un rôle important. Lœffler [7] a trouvé une relation entre les hématies mûriformes et l'abaissement de la pression de CO_2 du liquide de suspension. En des conditions expérimentales qui excluent des modifications de concentration du milieu de suspension, l'état mûriforme est réversible. Les hématies reprennent leur forme normale discoïde lorsqu'on augmente la pression du CO_2 du liquide. Weidenreich [2], en expérimentant au micromanipulateur sur des minces couches de plasma coagulé, avait observé le phénomène que nous venons de décrire, c'est-à-dire la transformation mûriforme réversible des hématies à l'approche de la pointe de verre. Il pense que ce phénomène pourrait être expliqué par des inégalités de tension à la surface des hématies, dues à la trame de fibrine qui les entoure, ou par des forces électriques. Il y voit la preuve de l'élasticité parfaite de la membrane globulaire. D'autres auteurs aussi avaient mis en relation la transformation mûriforme des hématies avec des phénomènes électriques. Ainsi, Brinkmann et van Dam [8] ont observé que les globules rouges deviennent mûriformes au moment ou ils touchent la lame de l'hématiemètre de Thoma-Zeiss. Ils expliquent ce phénomène par la charge électrostatique du verre qui aurait été électrisé par frottement au moment du nettoyage de la lame. Lorsqu'ils déchargent l'électricité du verre en passant au préalable par une flamme lame et lamelle, les hématies ne deviennent plus mûriformes en touchant le verre de la lame. Brinkmann et van Dam n'observent cette transformation mûriforme des hématies qu'après dilution du sang à l'eau salée ou après avoir lavé les globules au sérum physiologique. Ces opérations auraient pour effet d'enlever une partie du cholestérol adsorbé à la surface des hématies et de diminuer ainsi leur isolement électrique. Ponder [9] a étudié récemment l'action des surfaces de verre sur la transformation mûriforme des hématies. Il n'admet point une action électrostatique. Dans ses expériences, le passage de la lame et de la lamelle par une flamme n'empêche pas l'apparition des globules mûriformes. Pour Ponder, le phénomène est en rapport avec les propriétés réciproques du support et du liquide de suspension. En comparant l'action de

différents supports : verre, ébonite, celluloïde, bakélite, paraffine, etc., il trouve que seules les surfaces mouillées par le liquide de suspension provoquent l'apparition des hématies mûriformes. Ces transformations seraient dues aux forces d'attraction moléculaires des surfaces, dont le champ d'activité s'étendrait jusqu'à une distance de 10 μ environ.

Les recherches que nous venons de résumer plus haut ont pour objet d'établir les conditions extraglobulaires de la transformation mûriforme des hématies. Le phénomène essentiel et caractéristique se passe pourtant à l'intérieur du globule. Les recherches faites pour approfondir le côté globulaire de la transformation mûriforme sont bien peu nombreuses. Pulcher Claudio [10] étudie la transformation mûriforme en fonction de la concentration d'ions H'. Des hématies humaines mises en suspension dans du chlorure de sodium hypertonique à 1,3 %, tamponné à différents *p*H à l'aide de tampons de phosphates, présentent un pourcentage maximum de transformation mûriforme au *p*H de 6,8. Au-dessus et au-dessous de cette concentration d'ions H', le nombre des hématies mûriformes diminue et les globules tendent vers la forme sphérique. A un *p*H de 5,5, de même qu'à un *p*H de 8,6, Pulcher ne trouve plus d'hématies mûriformes ou épineuses. La transformation mûriforme passe par un maximum au *p*H qui correspond à la zone isoélectrique de l'hémoglobine humaine, aux environs de 6,8. Elle paraît être en relation avec certaines modifications physico-chimiques endoglobulaires d'une nature plus complexe que la perte d'eau.

Nos expériences nous ont montré que la simple approche d'une pointe de verre peut provoquer la transformation mûriforme de certaines hématies. Cette transformation est parfaitement réversible. La pointe de verre n'est pas électrisée par frottement. Obtenue dans une flamme, elle se trouve dans les conditions des lames flambées de Brinkmann et van Dam. Les modifications que cette pointe peut provoquer dans le milieu de suspension des hématies sont des modifications mécaniques, des déplacements moléculaires ou ioniques. Les ions salins ne paraissent pas jouer un rôle dans l'action de la pointe de verre. Nous avons vu l'apparition de l'état mûriforme réversible se répéter identique avec des hématies lavées huit fois avec une solution isotonique de glucose, et suspendues dans cette même solution privée d'électrolytes. Il nous reste à discuter l'action des ions H' et OH'.

Dans le sang normal, au *p*H physiologique, les globules rouges

portent une charge électrique négative. L'hémoglobine est pourtant un colloïde électro-positif au même *p*H. Il est permis de supposer que la pointe de verre, elle-même chargée d'électricité négative par adsorption d'ions H' et OH', influence le sol d'hémoglobine par delà la barrière de la membrane globulaire. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons suspendu des hématies humaines normales dans des solutions isotoniques contenant des concentrations variables de chlorure d'aluminium. L'ion Al''' est fortement adsorbé par les hématies. A une concentration d'$AlCl_3$ M/1000, la charge négative normale de celles-ci est annulée par la triple charge positive des ions Al adsorbés. A cette concentration, les globules rouges sont à leur point isoélectrique, ils sont neutres, ne portent plus de charge électrique et leur suspension n'est pas stable. En quelques minutes, il se produit une agglutination et une sédimentation complète des hématies. Dans l'appareil d'électrocataphorèse de Michaelis, elles restent immobiles sous une tension de 180 volts. A une concentration d'$AlCl_3$ inférieure à M/1000, elles sont transportées vers l'anode; à une concentration supérieure, vers la cathode. Elles sont donc chargées d'électricité négative dans un cas et positive dans l'autre. Au micromanipulateur, elles présentent pourtant les unes et les autres la même transformation mûriforme à l'approche de la pointe de verre. Dans nos conditions expérimentales, la charge de la membrane globulaire ne paraît pas jouer un rôle dans la transformation mûriforme réversible. C'est le contenu globulaire qui doit nous donner la clef du problème. Il est vrai que le chlorure d'aluminium ne modifie pas uniquement l'état électrique de la membrane hématique. Il se produit en même temps, par dissociation électrolytique, une forte acidification du liquide de suspension, et nous avons vu, dans les expériences de Pulcher, que les ions H' et OH' jouent un rôle important dans la genèse des phénomènes étudiés.

Les faits établis, ainsi que le matériel expérimental présenté jusqu'ici, paraissent insuffisants pour résoudre le problème. Quittons donc, pour le moment, la voie suivie et analysons l'hématie mûriforme d'un autre point de vue.

De la discussion des phénomènes observés et de la littérature publiée sur ce sujet, nous pouvons pourtant conclure provisoirement que l'hématie mûriforme représente quelque chose de plus qu'une hématie qui a perdu une certaine quantité d'eau; que l'état mûriforme traduit des modifications physico-chimiques complexes. Du point de vue physique, cet état paraît être dû à

une solidification au moins partielle du contenu globulaire; à l'apparition d'un squelette moins plastique et moins rétractile, associée à une déshydratation partielle de l'hématie. La membrane globulaire suit la rétraction du contenu globulaire entre les pointes du squelette rigide qui demeurent proéminentes. Ces pointes donnent à l'hématie mûriforme son aspect si caractéristique. L'hypothèse d'un squelette à l'intérieur des hématies mûriformes, conséquence logique de ces observations morphologiques et de la rigidité mécanique qu'elles présentent au micromanipulateur, s'impose nécessairement à l'esprit.

CRISTALLISATION INTRAGLOBULAIRE DE L'HÉMOGLOBINE

La quantité d'hémoglobine contenue dans une hématie est relativement considérable. D'après Jolly [11], elle représente 96 % du poids globulaire sec. Aucune solution d'hémoglobine ne peut être obtenue à une concentration aussi élevée que celle qui se trouve à l'intérieur du globule rouge. Lorsqu'on concentre certaines solutions aqueuses d'hémoglobine, celles-ci cristallisent beaucoup avant d'avoir atteint la concentration intrahématique. D'autre part, si l'on hémolyse des hématies sans concentrer leur contenu, on obtient chez certains animaux un magma de cristaux d'hémoglobine. On en obtient encore en grande quantité, même si l'hémolyse est accompagnée d'une dilution du contenu globulaire. L'hémoglobine se trouve donc à l'intérieur des hématies normales, sous forme d'un sol extrêmement concentré. (Barcroft [13].)

En examinant au microscope polarisant des préparations natives de sang gardé quelque temps sous lamelle, nous avons pu mettre en évidence certaines modifications de l'ultrastructure des hématies humaines qui aboutissent à leur transformation en cristaux d'hémoglobine. Ce processus de cristallisation intraglobulaire de l'hémoglobine peut apporter de nouveaux documents au problème des hématies mûriformes. Le squelette que nous avons été obligé d'admettre, à la suite des considérations exposées plus haut, doit trahir son existence d'une certaine façon au cours de la cristallisation endoglobulaire. La différence de structure intérieure entre une hématie normale, plastique et fluide, et une hématie plus ou moins rigide, possédant une structure intérieure, doit se manifester au cours des transformations

endoglobulaires qui, remaniant les molécules d'hémoglobine, les orientent et les groupent jusqu'à obtenir la forme cristalline parfaite.

Ces phénomènes ouvrent une voie de recherches qui paraît riche de promesses. Suivons-la et voyons si elle nous rapproche de la solution cherchée.

Une préparation obtenue en étalant entre lame et lamelle une goutte de sang frais, lutée au du Noyer pour empêcher l'évapora-

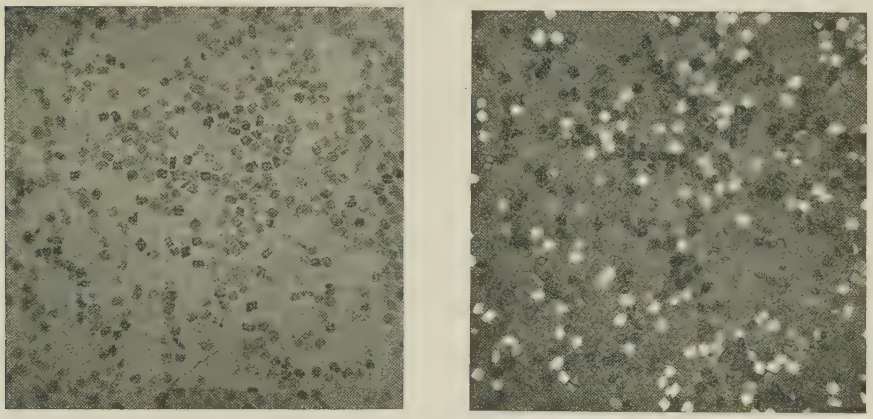


Fig. 4. — Microphotographies en lumière polarisée d'une préparation d'hématies humaines transformées en microcristaux d'hémoglobine.
A. Les nicols étant parallèles.
B. Les nicols étant croisés.

tion, reste obscure lorsqu'elle est examinée au microscope polarisant entre nicols croisés. Si l'on réexamine une telle préparation gardée à la température du laboratoire, l'on observe, après quelques jours ou semaines, des modifications d'aspect des hématies. On trouve des globules rouges qui apparaissent éclairés entre nicols croisés. Ces hématies transmettent une lumière qui est rose violacé pour quelques-unes ou violet brun foncé pour d'autres. Lorsqu'on fait tourner la préparation autour de l'axe optique du microscope, ces hématies changent quatre fois d'aspect au cours d'une rotation complète. Pour des

positions de la préparation qui diffèrent de 90° l'une de l'autre, les hématies rose violacé deviennent violet brun, tandis que celles violet brun deviennent rose violacé. Ce sont des hématies qui présentent la biréfringence caractéristique des cristaux dichroïques. Examinée en interposant un sensibilisateur de gypse donnant le rouge de premier ordre, la préparation montre d'une manière très nette les hématies biréfringentes qui gardent leur forme normale inaltérée. Avec le temps, toutefois, les hématies se déforment, prennent peu à peu une forme parallélépipédique ou rhomboïdale. A un certain moment, elles sont presque toutes biréfringentes et transformées en cristaux parfaits qui présentent tous les caractères morphologiques et optiques des cristaux d'hémoglobine.

A ce stade, on peut soulever la lamelle, sécher la préparation et la monter dans du baume du Canada, sans que les hématies perdent leur biréfringence. Si on les colore pourtant, soit aux mélanges panchromes de Giemsa, soit simplement à l'éosine ou au bleu de méthylène, la biréfringence disparaît. Lorsque la couche de liquide sous lamelle est assez épaisse, on peut surprendre les phases initiales de ces transformations. Nous avons pu observer ainsi des hématies entraînées et roulées par des courants de liquide à un moment ou l'on ne trouvait pas encore d'hématies anisotropes. En ces conditions, certaines hématies apparaissaient pourtant biréfringentes lorsque, au cours de leurs déplacements, elles se présentaient de profil. Vues de face, elles étaient isotropes comme toutes les autres hématies; sur la tranche, pourtant, elles étaient biréfringentes. La couche d'hémoglobine traversée par la lumière polarisée était en ce cas beaucoup plus épaisse.

Nous avons soumis à la cristallisation des hématies normales, ainsi que des hématies rendues mûriformes par une solution hypertonique de chlorure de sodium, toutes autres conditions étant égales. Les hématies mûriformes sont devenues biréfringentes plus tôt et en plus forte proportion que les hématies normales. Le fait ne doit pas surprendre. Le sol endoglobulaire d'hémoglobine y est plus concentré par la perte d'eau. Comme pour les hématies normales, les hématies mûriformes deviennent d'abord biréfringentes sans changer de forme, les molécules d'hémoglobine s'orientent à l'intérieur, puis peu à peu les pointes caractéristiques diminuent, puis disparaissent. L'aspect change et tout le globule prend la forme d'un cristal microscopique d'hémoglobine.

Les conditions exactes de la cristallisation endoglobulaire ne nous étaient pourtant pas connues. Parfois, on devait attendre des semaines pour obtenir les premières hématies biréfringentes. D'autres fois, sous la même lamelle, on trouvait des zones particulières de cristallisation presque complète, alors que tout le reste de la préparation ne présentait aucune modification optique des globules rouges. Pour préciser les conditions physico-chimiques du processus de cristallisation endoglobulaire, nous avons étudié d'abord le rôle de la concentration d'ions $H^{\cdot}$. A cet effet, nous avons suspendu des hématies humaines normales dans de l'eau physiologique légèrement hypertonique, tamponnée à différents *p*H à l'aide de tampons acide acétique-acétate de sodium. Nous avons noté l'aspect des hématies dans les différentes suspensions, ainsi que l'apparition et la proportion des globules biréfringents. Voici le protocole d'une telle expérience :

11 février 1932. — Dans chacun des neuf tubes d'essai en verre Pyrex employés pour cette expérience, on introduit 10 centimètres cubes de solution de chlorure de sodium à 9,75 ‰, puis 4 centimètres cubes de mélanges en proportions variables d'hydrate de sodium N/6 et d'acide acétique N/6. Ces mélanges sont obtenus en ajoutant, à 1 centimètre cube d'acide acétique N/6, des quantités décroissantes d'hydrate de sodium N/6, en commençant par 1,2 cc. et en diminuant, en progression géométrique à quotient 1,1, jusqu'au neuvième tube qui en reçoit 0,56 centimètre cube. On complète ensuite à 4 centimètres cubes avec du sérum physiologique à 9,75 ‰ (NaCl N/6). Chaque tube reçoit ensuite 1 centimètre cube de globules humains obtenus en diluant du sang défibriné avec un volume égal d'eau physiologique. On agite et on détermine ensuite, sur une partie de la suspension globulaire, la concentration d'ions $H^{\cdot}$ par méthode électrométrique, à l'aide d'électrodes de quinhydrone de Mislowitzer et d'un potentiomètre de Cambridge.

Dans les tubes 3, 4 et 5, on trouve un certain nombre d'hématies qui sont complètement déshydratées, aplaties, paraissant réduites à de simples écailles d'hémoglobine sèche. Ces hématies sont passées dans le tableau sous la rubrique « hématies lamellaires ». Dans les tubes 3 et 4, toutes les hématies mûriformes paraissent de même réduites à un minimum d'épaisseur, desséchées.

Le résultat de ces expériences confirme entièrement les recherches de Pulcher. Pour un *p*H de 6,50 qui correspond, selon A. Green [12], à la zone isoélectrique de l'hémoglobine, la biré-

fringence s'observe déjà après quelques heures. Après quarante-huit heures, 95 % des hématies à ce *p*H sont devenues biréfringentes. Cette zone de cristallisation optima correspond parfaitement à la zone optima de transformation mûriforme. Cristallisation et transformation mûriforme paraissent intimement associées. La cristallisation est plus complète à 8° C qu'à 37° C, et plus complète sous lamelle que dans le tube d'essai.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9
*p*H	7,30	7,02	6,50	6,20	5,97	5,70	5,34	5,18	4,98
Hématies sphériques	98 °/₀	30 °/₀					10 °/₀	30 °/₀	80 °/₀
Hématies normales ou cupuliformes					20 °/₀	60 °/₀	90 °/₀	70 °/₀	20 °/₀
Hématies mûriformes		70 °/₀	90 °/₀	95 °/₀	78 °/₀				
Hématies lamellaires			10 °/₀	5 °/₀	2 °/₀				
Hémolyse après 48 h.	++++							++	++++
Hématies biréfringentes après 6 h.			2 °/₀	5 °/₀					
Hématies biréfringentes après 48 h.		1 °/₀	60 °/₀	45 °/₀					
Hématies biréfringentes après 6 h. + 42 h. sous lamelle		1 °/₀	95 °/₀	95 °/₀	1 °/₀				

Les auteurs sont unanimes pour souligner la facilité d'obtenir des cristaux d'hémoglobine à partir des hématies lysées. On n'admet généralement pas la cristallisation endoglobulaire. Ainsi, Barcroft [13] ne trouve jamais de cristaux d'hémoglobine dans les hématies. Il admet qu'à l'intérieur des globules, les molécules d'hémoglobine ne sont pas libres de s'orienter selon les forces de cristallisation ; que la structure de l'hématie s'y oppose et décide, en quelque sorte, l'orientation moléculaire intraglobulaire. Jolly [14] admet la transformation des hématies en cristaux d'hémoglobine isolés ou groupés. Cette transformation serait pourtant irréversible et liée à la destruction des hématies. La cristallisation endoglobulaire que nous venons de décrire nous montre quelques aspects morphologiques intéressants pour le problème des hématies mûriformes. La grande majorité des

hématies deviennent homogènement biréfringentes, qu'elles soient d'aspect normal ou mûriformes. Quelques-unes présentent pourtant des zones de cristallisation multiples caractérisées par des différents axes de biréfringence. En examinant au sensibilisateur de gypse, on trouve ainsi, assez rarement d'ailleurs, des hématies qui présentent deux ou plusieurs couleurs d'interférence bien délimitées entre elles. Ces hématies se transforment en un groupe de microcristaux accolés. Parfois, une hématie mûriforme présente, pour une pointe, un axe de cristallisation et, par suite, de biréfringence, différent de celui du reste du globule. Ces cas font exception. En règle générale, la biréfringence observée est bien homogène. Toutes les molécules d'hémoglobine du même globule sont orientées selon le même axe de cristallisation. Nous avons souligné le fait que les hématies mûriformes sont les premières à devenir biréfringentes et qu'elles forment le pourcentage maximum des hématies anisotropes.

Le fait que ces hématies mûriformes sont homogènement biréfringentes est pourtant en contradiction avec l'hypothèse qui leur attribue un squelette intraglobulaire. Il est vrai qu'un tel squelette peut expliquer l'apparition plus rapide de la biréfringence des hématies mûriformes. Il est bien établi que toute surface étrangère, qui se trouve dans un milieu en voie de cristallisation, favorise et accélère ce processus en servant comme germe cristallin. En ce cas, la cristallisation endoglobulaire ne serait pourtant pas homogène. Elle serait nécessairement à centres multiples. Par suite, le globule rouge mûriforme serait transformé en une mosaïque de petits cristaux conglomérés ayant germé chacun sur un point particulier de la surface du squelette présumé, et possédant chacun son propre plan de polarisation. Nous avons vu qu'il n'en est rien. L'homogénéité de l'anisotropie des hématies mûriformes nous oblige donc de rejeter l'hypothèse d'un squelette intraglobulaire.

L'observation exacte des phénomènes décrits jusqu'ici, ainsi que leur analyse logique, nous impose pour l'hématie mûriforme, d'une manière tout aussi indiscutable, d'une part l'hypothèse d'un squelette intraglobulaire, et d'autre part l'hypothèse contraire. Nous pensons que la seule voie, pour sortir de ce dilemme, est d'admettre l'hypothèse d'un squelette formé uniquement par l'hémoglobine gélifiée. Cette hypothèse explique toutes les observations en apparence contradictoires. Un tel squelette d'hémoglobine gélifiée peut donner, à l'hématie mûriforme, et son aspect morphologique et sa rigidité caractéristiques. Ce même gel d'hé-

moglobine peut favoriser l'apparition de la biréfringence des hématies mûriformes, étant une étape sur la voie de réalisation de la stabilité maxima qui est représentée par la structure cristalline. On connaît de multiples exemples de cristallisation ultérieure, lente, de précipités amorphes tant dans le domaine de la chimie classique que dans celui de la chimie physique des colloïdes. La biréfringence, qui se manifeste ainsi par remaniement secondaire des molécules d'hémoglobine gélifiée, est homogène, puisqu'il n'y a pas de surfaces étrangères servant de germes multiples de cristallisation. Cette hypothèse explicative résoud le dilemme du squelette endoglobulaire et cadre avec toutes les données expérimentales. Ainsi la gélification de l'hémoglobine endoglobulaire est maxima dans la zone de *p*H qui correspond à son point isoélectrique. Dans cette zone on trouve, comme nous l'avons vu, le plus grand nombre d'hématies mûriformes.

Les hématies ont une vie individuelle relativement bien courte. Les hématies usées sont continuellement remplacées par des éléments jeunes. Il doit, par conséquent, exister des différences bien appréciables entre les différentes hématies d'une même goutte de sang. Ces différences doivent se manifester surtout pour l'élément fonctionnel, pour l'hémoglobine qui représente un pourcentage si important du volume de l'hématie. Nous pensons qu'elles peuvent se traduire par des tendances différentes à gélifier. Si l'on applique la règle commune à tous les colloïdes, c'est l'hémoglobine la plus âgée qui doit gélifier le plus aisément. Dans des liquides hypertoniques, toutes les hématies ne deviennent pas mûriformes au même moment et au même degré, bien que le milieu qui les entoure soit le même pour toutes. L'état mûriforme varié, qui apparaît en ces conditions, traduit peut-être des états physico-chimiques différents de l'hémoglobine endoglobulaire à différents moments de son évolution.

L'hématie, vue par cette hypothèse, nous apparaît comme une goutte d'hémoglobine fluide, un sol très concentré en équilibre physico-chimique dans les conditions normales du milieu sanguin physiologique. Cet équilibre serait pourtant peu stable pour les conditions anormales du sang examiné *in vitro*. Sa destruction serait suivie par la gélification du sol d'hémoglobine endoglobulaire. La membrane du globule, très riche en lipides, peut aussi gélifier en certaines conditions et expliquer ainsi l'existence des fantômes globulaires mûriformes, c'est-à-dire d'hématies qui ont perdu leur hémoglobine après être devenues mûriformes. Weidenreich [2], à la suite de ses recherches au micromanipula-

teur, admet que le globule rouge est formé par une goutte fluide sans structure intérieure, entourée d'une membrane continue et élastique. Il a vu les hématies normales perdre leur contenu après avoir été piquées par l'aiguille du micromanipulateur, se vider de leur sol d'hémoglobine, cependant que leur membrane restait accrochée à la pointe de verre, ratatinée et informe. Nous avons répété ces expériences sur des hématies normales et sur des hématies rendues mûriformes par des solutions hypertoniques ou par des solutions isotoniques à un *p*H convenable. Lorsqu'on pique une hématie normale, celle-ci devient brusquement parfaitement circulaire et prend un aspect homogène. En quelques instants, sa couleur pâlit, puis disparaît. Une fraction de seconde, le fantôme globulaire reproduit encore la forme de l'hématie primitive, puis il se déforme, se ratatine, s'accole à la pointe de l'aiguille comme une masse informe, visqueuse. Lorsqu'on pique des hématies mûriformes, les phénomènes observés sont différents. Les unes deviennent parfaitement circulaires et disparaissent ensuite comme les hématies normales, mais beaucoup plus lentement. Elles paraissent avoir un contenu plus visqueux. D'autres deviennent circulaires et homogènes, mais ne perdent pas leur contenu. Elles demeurent colorées et circulaires comme si l'orifice produit par l'aiguille s'était refermé ultérieurement. D'autres hématies mûriformes, enfin, peuvent être percées de part en part sans présenter des modifications de forme ou de contenu. Elles paraissent complètement gélifiées et cette transformation est irréversible. D'une consistance spéciale, cireuse on dirait, elles gardent l'orifice produit par l'aiguille, mais aussi leur contenu d'hémoglobine. Ces observations corroborent l'hypothèse de la gélification de l'hémoglobine et nous montrent les différentes phases du processus invoqué.

Nous pouvons résumer nos résultats du point de vue physico-chimique en présentant les hématies comme des gouttes de sol très concentré d'hémoglobine, ne possédant pas de structure intérieure et présentant, surtout pour les éléments âgés, un état d'équilibre peu stable. La gélification du sol d'hémoglobine, résultat de la destruction de cet équilibre, se produit par étapes successives qui progressent à partir de certains centres de précipitation qui paraissent prédéterminés comme nombre et conditionnés par certaines particularités physico-chimiques endoglobulaires individuelles. Les stades successifs sont de plus en plus stables. L'hématie mûriforme réversible, première étape dans cette série de transformations, traduit la multiplicité des centres

de précipitation par son aspect de sphérites accolées et entourées d'une membrane unique. Le remaniement secondaire de l'ultrastructure intervient ensuite et oriente les molécules d'hémoglobine selon les axes de cristallisation. Dans ces premiers stades, cette orientation est réversible. Elle peut disparaître sous l'influence de facteurs mécaniques, chimiques ou osmotiques. Dans les stades plus avancés, l'ultrastructure est plus stable. La dernière étape est formée par des cristaux caractéristiques qui ont remplacé les hématies sans les détruire.

Le problème qui s'est posé au début de ces recherches se précise. L'aiguille du micromanipulateur paraît provoquer indirectement à l'intérieur des hématies des modifications physico-chimiques de l'hémoglobine, une gélification et une déshydratation du contenu globulaire. Cette perte d'eau accompagne nécessairement la diminution de dispersion de l'hémoglobine gélifiée. Le nombre des molécules ou ions actifs du point de vue osmotique diminuant, l'eau diffuse vers le milieu extraglobulaire à pression osmotique relative plus élevée maintenant.

Nous avons varié la nature de la pointe employée pour provoquer l'état mûriforme, afin de préciser le mécanisme de cette action. Nous avons employé des aiguilles de quartz, des aiguilles de verre argentées ou vernies à l'aide d'une solution alcoolique de benjoin, des aiguilles métalliques ainsi que des poils d'animaux. Nous avons pu provoquer l'état mûriforme des hématies dans tous ces cas. La nature de la pointe paraît jouer un rôle secondaire dans la genèse de l'état mûriforme. C'est la production du ménisque liquide autour de la pointe de l'aiguille qui est le phénomène commun dans toutes ces expériences. Si l'on rapproche ce fait de celui signalé à propos des hématies mûriformes entraînées, par l'aiguille du micromanipulateur, dans une zone très pauvre en liquide où elles s'aplatissent, une explication simple se présente à l'esprit. Toute hématie qui devient mûriforme, à l'approche de la pointe de l'aiguille, est une hématie dont l'hémoglobine est déjà gélifiée, mais qui a perdu cet état pour le moment par l'action de la membrane de tension superficielle qui l'accole contre la lamelle et l'y comprime. Aussitôt que, par l'approche de l'aiguille et la formation d'un ménisque, la membrane de tension superficielle s'éloigne de l'hématie, celle-ci reprend son aspect mûriforme. Cette explication suppose que la membrane de tension superficielle est capable, tant qu'elle est intimement appliquée contre l'hématie, de suspendre l'état mûriforme, de ramener à sa fluidité primitive l'hémoglobine gélifiée.

Lorsqu'on examine les bords d'une préparation fraîche de globules mûriformes, au moment ou par dessiccation la couche de liquide dans laquelle se trouvent ceux-ci devient très mince, on voit les hématies mûriformes s'affaisser brusquement, se fluidifier et reprendre leur apparence normale sous l'influence de la membrane de tension superficielle. Nous avons répété cette expérience au micromanipulateur sur des hématies mûriformes suspendues dans du sérum physiologique. A l'aide d'une micropipette, nous avons varié alternativement la quantité de liquide de suspension. Toutes les hématies, qui étaient mûriformes dans une couche épaisse de liquide, devenaient circulaires et plates, d'aspect normal, lorsque la couche de liquide était réduite à un film très mince. Elles redevenaient mûriformes, lorsqu'on augmentait de nouveau la quantité de liquide de suspension. Le phénomène est réversible et de tous points analogue à celui provoqué par la pointe de verre. Il paraît probable que l'instrument du micromanipulateur provoque l'apparition d'hématies mûriformes uniquement en augmentant localement la quantité du liquide de suspension, en éloignant la membrane de tension superficielle qui aplatissait les hématies dont l'hémoglobine était déjà gélifiée.

CONCLUSIONS

L'état mûriforme des hématies humaines provoqué par la pointe de l'aiguille du micromanipulateur est réversible.

Les hématies mûriformes ont un squelette intérieur possédant une certaine rigidité mécanique.

Ce squelette paraît être formé par l'hémoglobine intraglobulaire gélifiée. L'hémoglobine intraglobulaire peut cristalliser facilement.

L'hématie se transforme, en ce cas, en un cristal microscopique d'hémoglobine en passant par un état intermédiaire.

Cet état intermédiaire peut être mis en évidence par l'examen microscopique en lumière polarisée.

La gélification de l'hémoglobine, l'état mûriforme des hématies, ainsi que la cristallisation endoglobulaire de l'hémoglobine, passent par un optimum pour un *p*H de 6,5.

L'état mûriforme est réversible sous l'action de la membrane de tension superficielle du milieu de suspension.

L'action de la pointe de l'aiguille du micromanipulateur paraît être due à l'augmentation locale de la quantité de liquide de suspension résultant de la formation d'un ménisque autour de cette pointe.

BIBLIOGRAPHIE

1. Seifriz (William) : « The physical properties of erythrocytes. » (*Protoplasma*, 1, 1927, p. 345.)
2. Weidenreich : « Mitteilungen über den Bau der roten Blutkörperchen auf Grund von Untersuchungen mit dem Mikromanipulator. » (*Arch. f. exp. Zellsforsch.*, 6, 1928, p. 269.)
3. Simmel (Hans) : « Mikrurgische Untersuchungen an Erhytrocyten und Leucocyten. » (*Zeitschr. f. exp. Med.*, 75, 1931, p. 179.)
4. Waller (W.-W.) : « Crenation of human erythrocytes and its reversibility. » (*J. of Physiol.*, 70, 1930, p. XLII.)
5. Bürker (K.) : « Die körperlichen Bestandteile des Blutes », in *Hdb. d. norm. u. path. Physiologie*. Berlin, J. Springer, vol. VI-1, 1928, p. 10.
6. Ponder (Eric) et Saslow (G.) : « The measurement of red cell volume. II. Alterations in cell in solutions of various tonicities. (*J. of. Physiol.*, 70, 1930, p. 169.)
7. Loeffler (Lothar) : « Zur Frage des Entstehung der Stechapfelform der roten Blutkörperchen. » (*Arch. f. exp. Path. und Pharmakol.*, 123, 1927, p. 1.)
8. Brinkmann (R.) et Dam (van) : « Studien zur Biochemie der Phosphatide und Sterine. » (*Bioch. Zeitschr.*, 108, 1920, p. 52.)
9. Ponder (Eric) : « On the spherical form of the mammalian erythrocyte. » (*British J. exp. Biol.*, 6, 1929, p. 387 ; cité d'après *Ber. ü. d. ges. Physiol*, 53, 1930, p. 528.)
10. Claudio (Pulcher) : « Sul raggrinzamento degli eritrociti in rapporto al punto isoelettrico dell'emoglobina. » (*Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 6, 1931, p. 43 ; cité d'après *Ber. ü. d. ges. Physiol.*, 62, 1931, p. 344.)
11. Jolly (J.) : *Traité technique d'hématologie*. Paris, A. Maloine, vol. 1, 1923, p. 144.
12. Green (A.-A.) : « Studies in the physical chemistry of proteins. IX. The effect of electrolytes on the solubility of haemoglobin in solutions of varying hydrogen ion activity. » (*J. Biol. Chemistry*, 93, 1931, p. 517.)
13. Barcroft (J.) : The respiratory function of the blood. Part II. Haemoglobin. » (*Cambridge University Press.*, 1928, p. 5 et p. 69.)
14. Jolly (J.) : *op. cit.*, p. 86.

Le Gérant : J. Caroujat. NIORT. — IMP. TH. MARTIN